

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Ústav pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i.



**Charakterizace extracelulárních a intracelulárních
organických látek produkovaných fytoplanktonem
ve vztahu k procesům úpravy vody**

*Characterization of extracellular and intracellular
organic matter produced by phytoplankton
in relation to water treatment*

Tereza Zezulová

Vedoucí práce: RNDr. Martin Pivokonský, Ph.D.

srpen 2015

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně s využitím uvedené literatury a informací, na něž odkazuji. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré (i přejaté) informace budou řádně citovány. Rovněž prohlašuji, že předložená diplomová práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze dne 14. 8. 2015

Tereza Zezulová

Děkuji RNDr. Martinu Pivokonskému, PhD. za odborné a přátelské vedení a dále všem, kteří přispěli ke vzniku práce. Rovněž si cením podmínek, které mi byly vytvořeny na Ústavu pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i. pro vypracování této práce.

Obsah

Abstrakt	5
Seznam použitých zkratk a symbolů	7
1. Úvod	9
2. Literární rešerše	11
2.1. Přírodní organické látky	11
2.1.1. AOM (Algal organic matter)	11
2.1.2. Cyanotoxiny	13
2.2. Vliv AOM na procesy úpravy vody	15
2.2.1. Desinfekce vody a tvorba DBPs	17
2.3. Vybrané mikroorganismy	19
3. Materiál a metodika	22
3.1. Druhy řas	22
3.2. Kultivace	22
3.3. Monitoring průběhu kultivace	22
3.5. Charakterizace AOM	24
3.5.1. SUVA	24
3.5.2. Příprava EOM	24
3.5.3. Příprava COM	25
3.5.4. Stanovení podílu peptidové/proteinové složky	25
3.5.5. Stanovení hydrofobních/hydrofilních frakcí	25
3.5.6. Molekulové hmotnosti organických látek	26
4. Výsledky a diskuse	27
4.1. Růst fytoplanktonu	27
4.2. Peptidová/proteinová a neproteinová složka	31
4.3. Hydrofilní a hydrofobní frakce	34
4.4. Hodnoty SUVA	37
4.5. Molekulové hmotnosti	39
5. Závěr	46
6. Použitá literatura	48

Abstrakt

Práce se zabývá charakterizací látek produkovaných fytoplanktonem (AOM – Algal Organic Matter) čtyř druhů mikroorganismů: sinicemi *Microcystis aeruginosa* a *Merismopedia tenuissima*, rozsivkou *Fragilaria crotonensis* a zelenou řasou *Chlamydomonas geitleri*. Druhy *M. aeruginosa*, *F. crotonensis* a *Chl. geitleri* byly vybrány jako dominantní zástupci fytoplanktonu nejvýznamnější vodárenské nádrže v ČR Švihov (Úpravna vody Želivka) a *M. tenuissima* jako dominantní zástupce fytoplanktonu ve vodárenské nádrži Josefův Důl (Jizerské hory). Uvedené mikroorganismy byly kultivovány v laboratorních podmínkách a průběh kultivace (růst biomasy) byl monitorován pomocí počtu buněk, chlorofylu-a a optické hustoty. Látky produkované fytoplanktonem byly monitorovány pomocí rozpuštěného organického uhlíku a dále byly charakterizovány pomocí specifické UV absorbance, množství peptidové/proteinové a nepeptidové (sacharidové) složky, afinity k vodě a molekulových hmotností (MW). Bylo zjištěno, že AOM všech studovaných mikroorganismů jsou tvořeny převážně hydrofilními látkami s nízkými hodnotami specifické UV absorbance ($< 2 \text{ L}/(\text{m} \cdot \text{mg})$). Dominantní podíly obou skupin AOM, tj. extracelulárních i celulárních organických látek představují látky s $\text{MW} < 1 \text{ kDa}$ a s $\text{MW} > 100 \text{ kDa}$, avšak celkové množství a složení AOM se významně liší v závislosti na druhu a stáří kultury. Z výsledků je zřejmé, že složení AOM a jejich vlastnosti předurčují, které technologické postupy budou účinné pro jejich odstranění při úpravě vody.

Klíčová slova:

AOM – organické látky produkované fytoplanktonem; EOM – extracelulární organické látky; COM – celulární organické látky; DOC – rozpuštěný organický uhlík; peptidy/proteiny; polysacharidy; hydrofobicita/hydrofilicita; molekulové hmotnosti

Abstract

This study investigated characteristics of algal organic matter (AOM) derived from four species (cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Merismopedia tenuissima*, diatom *Fragilaria crotonensis* and green alga *Chlamydomonas geitleri*) dominating phytoplanktonic populations in the reservoirs supplying drinking water treatment plants – the water reservoirs Švihov (the Želivka water treatment plant) and Josefův Důl (the Jizerské Mountains), Czech Republic. The four mentioned microorganisms were cultivated under laboratory conditions and the algal growth was quantified by a number of cells, chlorophyll-a and optical density. Production of AOM was evaluated by dissolved organic carbon concentration measurements, by specific UV absorbance, the amount of peptide/protein and non-peptide (carbohydrate) contents, water affinity and molecular weight (MW). AOM of all considered microorganisms are formed predominantly by hydrophilic substances with low values of specific UV absorbance ($< 2 \text{ L}/(\text{m}.\text{mg})$). Considerable portions of both types of AOM, i.e. extracellular and cellular organic matters are represented by substances with $\text{MW} < 1 \text{ kDa}$ or with $\text{MW} > 100 \text{ kDa}$. However, the total amount and composition of AOM significantly depend on algal species and their growth. The obtained results imply that the knowledge of AOM composition and characteristics predetermine the processes which are effective in the treatment of AOM laden water.

Keywords:

AOM – algal organic matter; EOM – extracellular organic matter; COM – cellular organic matter; DOC – dissolved organic carbon; peptides/proteins; polysaccharides; hydrophobicity/hydrophilicity; molecular weight

Seznam použitých zkratek a symbolů

AC (Activated Carbon) – aktivní uhlí

AK – aminokyselina

AOM (Algal Organic Matter) – organické látky produkované fytoplanktonem

AXT – anatoxin

CC (Cell Count) – počet buněk

COM (Cellular Organic Matter) – celulární organické látky

CYN – cylindrospermopsin

DAD (Diode Array Detector) – detektor s diodovým polem

DAF (Dissolved Air Flotation) – flotace rozpuštěným vzduchem

DBPs (Disinfection By-Products) – vedlejší produkty desinfekce vody

DCAA (Dichloroacetic Acid) – kyselina dichloroctová (CHCl_2COOH)

DOC (Dissolved Organic Carbon) – rozpuštěný organický uhlík

DOC_{NP} – rozpuštěný organický uhlík neproteinových látek

DOC_{P} – rozpuštěný organický uhlík proteinových látek

DOC_{T} – celkový rozpuštěný organický uhlík

EOM (Extracellular Organic Matter) – extracelulární organické látky

EXP – exponenciální fáze růstu

GAC (Granular Activated Carbon) – granulované aktivní uhlí

GSM – geosmin (trans-1,10-dimetyl-trans-9-decalol)

HAAs (Haloacetic Acids) – halogenderiváty kyseliny octové

HCl – kyselina chlorovodíková

HPI – hydrofilní frakce

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPO – hydrofobní frakce

HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) – vysokoúčinná velikostně rozdělující chromatografie

Chl-a – chlorofyl a

IC (Inorganic Carbon) – anorganický uhlík

IOM (Intracellular Organic Matter) – intracelulární organické látky

MCAA (Monochloroacetic Acid) – kyselina chloroctová (CH_2ClCOOH)
 MCLR – microcystin-LR (L – leucin, R – arginin)
 MCRR – microcystin-RR (R – arginin)
 MCS – microcystin
 MF – mikrofiltrace
 MIB – 2-metylisoborneol
 MW (Molecular Weight) – molekulová hmotnost
 NF – nanofiltrace
 NOD – nodularin
 NOM (Natural Organic Matter) – přírodní organické látky
 OD (Optical Density) – optická hustota
 PAC (Powdered Activated Carbon) – práškové aktivní uhlí
 PSPs (Paralytic Shellfish Poisons) – paralytická otrava z měkkýšů
 R^2 – koeficient determinace
 SOM (Surface-bonded/Surface-retained Organic Matter) – organické látky vázané na povrchu buněk
 SUVA – specifická UV absorbance
 STAT – stacionární fáze růstu
 SXT – saxitoxin
 T&O (Taste and Odor Compounds) – sloučeniny způsobující nepříjemný zápach a negativně ovlivňující chuťové vlastnosti vody
 TC (Total Carbon) – celkový uhlík
 TCAA (Trichloroacetic Acid) – kyselina trichloroctová
 THAA (Trihalogenacetic Acid) – kyselina trihalogenoctová
 THMs (Trihalogenmethanes) – trihalogenmetany
 TPI – transfilní frakce
 UF – ultrafiltrace
 UTOX (Unknown Total Organic Halogen) – veškeré neznámé organické halogeny

1. Úvod

Povrchové vody obsahují velké množství organických látek přírodního původu, tzv. NOM (Natural Organic Matter). Významnou součástí NOM jsou také látky produkované fytoplanktonem souhrnně nazývané AOM (Algal Organic Matter). AOM se do povrchových vod dostávají jednak jako tzv. extracelulární organické látky (EOM) uvolňované během růstu organismu a také ve formě intracelulárních látek (IOM) při lyzi buněk (Pivokonský a kol., 2006, 2014). Při nadměrném rozvoji fytoplanktonu mají AOM značný vliv na technologie používané při úpravě vody. Způsobují zejména poruchy koagulace (Šafaříková a kol., 2013), adsorpce na aktivním uhlí (Kopecká a kol., 2014) nebo zanášení filtračních membrán (Zhang a kol., 2011; Qu a kol., 2012). Během hygienického zabezpečení vody jsou AOM významnými prekursory vedlejších produktů desinfekce vody, tzv. DBPs (Disinfection By Products), z nichž celá řada má toxické nebo karcinogenní účinky (Richardson a kol., 2011). Některé, zejména intracelulární, AOM jsou toxické. Jedná se o tzv. cyanotoxiny.

Z výše uvedeného je zřejmé, že AOM mají značný vliv nejen na kvalitu a složení surové vody, ale také na konečný produkt procesu úpravy vody na vodu pitnou.

Diplomová práce se zabývá popisem produkce a charakterizací AOM sinic *Microcystis aeruginosa* a *Merismopedia tenuissima*, rozsivkou *Fragilaria crotonensis* a zelenou řasou *Chlamydomonas geitleri*, a to s ohledem na procesy spojené s úpravou vody.

Mezi hlavní cíle práce patří především

- (1) popsat průběh produkce AOM v závislosti na růstové fázi vybraných mikroorganismů,
- (2) porovnat produkci AOM jednotlivých mikroorganismů
- (3) charakterizovat vlastnosti AOM významné pro proces úpravy vody.

Na základě těchto cílů byly stanoveny následující předpoklady:

1. Produkce organických látek je závislá na druhu organismu (sinice vs. zelená řasa).
2. Sinice produkují ve srovnání se zelenou řasou a rozsivkou větší množství peptidové/proteinové složky AOM.
3. Množství a složení AOM se mění v závislosti na růstové fázi mikroorganismů.
4. Celulární organické látky jsou tvořeny větším množstvím látek ve srovnání s extracelulárními AOM.

2. Literární rešerše

2.1. Přírodní organické látky

Ve všech povrchových vodách se nachází řada organických látek přírodního původu, tzv. NOM (Natural Organic Matter) (Matilainen a kol., 2010; Penru a kol., 2013; Pivokonský a kol., 2014). Jedná se o látky rozdílného chemického složení, struktury, velikosti a molekulové hmotnosti (Leenheer a Croue, 2003; Chon a kol., 2013; Pivokonský a kol., 2014).

Podrobněji se NOM dělí na huminové a nehuminové látky. Mezi huminové látky řadíme huminy, huminové kyseliny a fulvokyseliny (Pivokonský a kol., 2011; Chon a kol., 2013). Látky nehuminové povahy jsou reprezentovány především látkami produkovanými fytoplanktonem, tzv. AOM (Algal Organic Matter). Nejvyšších koncentrací dosahují AOM v letních měsících při masovém rozvoje sinic a řas (Pivokonský a kol., 2006, 2014).

AOM jsou v povrchových vodách přítomny v různých koncentracích a bylo prokázáno, že již v koncentracích od 1mg/l (měřeno jako DOC – Dissolved Organic Carbon) zásadně ovlivňují upravitelnost vody na vodu pitnou (Pivokonský 2009, 2012, 2015; Šafaříková 2013).

2.1.1. AOM (Algal organic matter)

AOM se do vody uvolňují metabolickými pochody sinic a řas ve formě tzv. extracelulárních organických látek (EOM – Extracellular Organic Matter) a jako tzv. intracelulární organické látky (IOM – Intracellular Organic Matter) při rozkladu buněk (Pivokonský a kol., 2006, 2014). Řada autorů odlišuje mimo EOM a IOM také organické látky vázané k povrchu buněk (SOM – Surface-bonded Organic Matter) (Fogg, 1983; Takaara a kol., 2007; Henderson a kol., 2008; Ma a kol., 2012; Leloup a kol., 2013). IOM a SOM se společně označují jako tzv. celulární organické látky (COM – Cellular Organic Matter) (Takaara a kol., 2007; Ma a kol., 2012; Pivokonský a kol., 2014). EOM převažují v exponenciální fázi růstu, při stárnutí kultury, kdy dochází k odumírání mikroorganismů, se zvyšuje podíl COM (Pivokonský a kol., 2006, 2014; Takaara a kol., 2007; Henderson a kol., 2008).

Složení AOM je velmi různorodé a závisí zejména na druhu fytoplanktonu, růstové fázi, stáří a kondici kultury (Hoyer a kol., 1985; Pivokonský a kol., 2006, Henderson a kol., 2008). AOM vykazují v rámci molekulových hmotností široké

spektrum sloučenin od několika Da až po stovky kDa. Mezi nízkomolekulární sloučeniny (< 10 kDa) se řadí uhlovodíky, aldehydy, aminy, aminokyseliny a peptidy, ale také např. cyanotoxiny a dále také mono- a di-sacharidy (Pivokonský a kol., 2006; Huang a kol., 2007). Složku AOM v rozmezí 10–100 kDa tvoří proteiny plnicí často funkci enzymů a některé složené sacharidy. Vysokomolekulární frakce (> 100 kDa) je pak tvořena výhradně proteiny a polysacharidy (Henderson a kol., 2008; Li a kol., 2012; Pivokonský a kol., 2014). AOM jsou tvořeny převážně hydrofilními látkami. Jejich zastoupení se v závislosti na druhu mikroorganismu a jeho růstové fázi pohybuje od cca 50 do 70 % z celkových AOM a zahrnují především sacharidy, hydroxykyseliny, nízkomolekulární karboxylové kyseliny, aminosacharidy, aminokyseliny, peptidy, proteiny, nízkomolekulární alkylalkoholy, aldehydy a ketony (Her a kol., 2004; Nguyen a kol., 2005; Pivokonský a kol., 2014). Hydrofobní část AOM je pak tvořena především uhlovodíky, vysokomolekulárními alkylaminy, vysokomolekulárními alkylkarboxykyseliny a aromatickými kyselinami (Fogg, 1971; Edzwald, 1993).

Významnou součástí AOM jsou peptidy/proteiny, které jsou součástí EOM i COM (Pivokonský a kol., 2006, 2014). Jejich podíl je závislý na druhu fytoplanktonu a stáří kultury. U sinic tvoří peptidy/proteiny cca 40-70 %, u zelených řas a rozsivek cca 10-50 % (Pivokonský a kol., 2014). Se stárnutím kultury mikroorganismů se množství peptidů/proteinů postupně zvyšuje a v nejvyšších koncentracích jsou zastoupeny v COM. Mezi další významné složky AOM patří sacharidy a polysacharidy. Jednoduché sacharidy a alditoly (cukerné alkoholy) se nachází v malém množství především jako součást EOM (Hellebust, 1974). Složené sacharidy a polysacharidy se vyskytují jako součást EOM i COM. Jejich základními stavebními jednotkami jsou převážně glukóza, fruktóza, galaktóza a manóza (Fogg, 1971; Maksimova a kol., 2004). Přesné složení a množství sacharidové složky je závislé na dostupnosti živin a fotosyntetické aktivitě organismů (Fogg, 1971).

Z dalších látek méně zastoupených v AOM jsou významné zejména kyselina glykolová, lipidy a fenoly. Kyselina glykolová je produkována převážně zelenými řasami a vyskytuje se jako součást EOM i COM (Fogg, 1971). Její sůl, glykolát, se uvolňuje při nízkých koncentracích oxidu uhličitého (CO₂), kdy je inhibovaná fotosyntéza a jeho množství výrazně závisí na druhu organismu (Hellebust, 1974). Lipidy jsou spíše součástí COM. Jako složka EOM se nachází pouze u některých druhů sinic a řas (Hellebust, 1974). Některé druhy fytoplanktonu mohou reagovat na nedostatek dusíku až několikanásobným zvýšením obsahu lipidů ve svých buňkách

(Shifrin a Chrisholm, 1981). Fenolové sloučeniny nejčastěji tvoří některé druhy hnědých řas (*Fucus vesiculosus*) a vyskytují se jako součást COM (Hellebust, 1974).

2.1.2. Cyanotoxiny

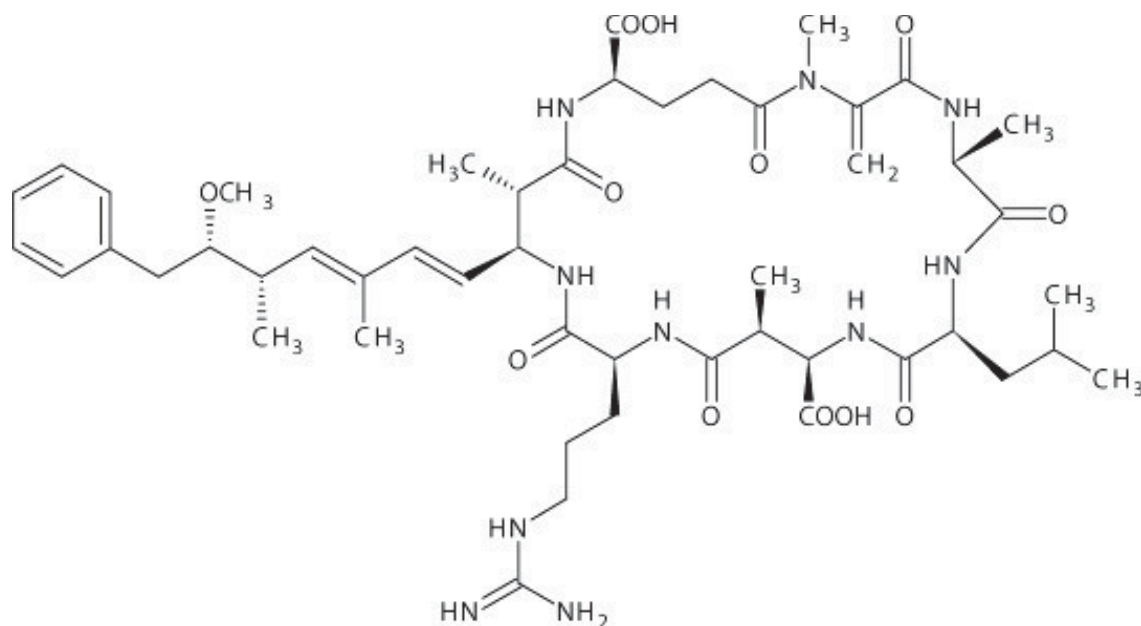
Řada sinic produkuje toxické biologicky aktivní látky zvané cyanotoxiny (Bláha a kol., 2009, Jančula a kol., 2014; Zhou a kol., 2014). Jejich funkce nebyla dosud zcela objasněna. Nejčastěji se jim přisuzuje strukturní funkce, účast v metabolických pochodech, role v uskladnění živin (chelatace železa), signální funkce, nebo funkce obranných molekul zejména proti zooplanktonu. Jiné hypotézy vysvětlují jejich tvorbu jako prostředek k potlačení konkurenčních organismů vedoucí k dominanci jednotlivých druhů sinic ve vodách (*Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, aj.) (Babica a kol., 2004). Do vody jsou cyanotoxiny vylučovány zejména metabolickými pochody během všech fází růstu a k jejich výraznému uvolňování pak dochází především v důsledku lyze buněk (přirozený nebo chemický stres) (Sivonen a Jones, 1999; Schmidt a kol., 2002). V současné době existuje více než 70 druhů toxických metabolitů, které mají různou toxicitu a afinitu k vodě (Ho a kol., 2006; Dixon a kol., 2010).

Dle biologické aktivity můžeme cytotoxiny rozdělit do následujících skupin.

Hepatotoxiny, mezi které řadíme nejčastěji se vyskytující microcystiny, jsou převážně produkovány sinicemi rodu *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* nebo *Nostoc* (Ho a kol., 2011, Jančula a kol., 2014, Quiblier a kol., 2013). Z chemického hlediska se jedná o cyklické peptidy s MW v rozsahu 800-1100 Da. Obsahují sedm aminokyselin s dvěma koncovými AK z lineárních peptidů, které jsou spojené za vzniku cyklického peptidu. Až na výjimky se jedná o látky rozpustné ve vodě (Chorus a Bartram, 1999). Doposud bylo detekováno okolo 80 druhů microcystinů, z nichž nejznámější jsou microcystin-LR (MCLR) a microcystin-RR (MCRR) (Meriuloto a Spoof, 2008). Struktura MCLR je znázorněna na obrázku 1. Limit pro výskyt MCLR v pitné vodě je stanoven na 1 µg/L (Vyhláška MZD 252/2004 Sb.). Dalším významným hepatotoxinem je nodularin, který je svým strukturním složením i biologickými účinky velmi podobný microcystinu (MCS). Je produkován převážně sinicí rodu *Nodularia* (Ho a kol., 2011). Oproti MCS je složen pouze z pěti AK. Jeho cyklické formy jsou až 100x více toxické než ekvivalentní lineární formy (stejně je to i u microcystinů) (Chorus a Bartram, 1999). Neméně významným hepatotoxinem je cylindrospermopsis uvolňovaný ze sinic rodu *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Umezakia* aj. (Hitzfeld a kol., 2000). Molekulová hmotnost je střední až nízká (< 1000 Da).

Neurotoxiny, kam řadíme anatoxiny a saxitoxiny jsou nízkomolekulární látky (MW < 300 Da). Anatoxiny jsou produkovány zejména rody *Anabaena*, *Phormidium*, *Nostoc* a *Oscillatoria* (Westrick a kol., 2010). Rody *Aphanizomenon*, *Anabaena* a *Planktotrix* jsou významní producenti dalšího neurotoxinu, saxitoxinu.

Obr. 1 Chemická struktura microcystinu-LR (Chorus a Bartram, 1999)



Známé jsou také jejich negativní účinky, zejména paralytická otrava z měkkýšů (Paralytic Shellfish Poisons – PSPs), která je velmi nebezpečná pro člověka (Pereira a kol., 2000). Tyto látky jsou ve vodě vesměs nerozpustné a tepelně stabilní (běžná tepelná úprava nevede k jejich odstranění) (Clark a kol., 1999).

Endotoxiny, zejména lipopolysacharidy se nacházejí v buněčných stěnách sinic (Chorus a Bartram, 1999).

Dermatotoxiny jsou alkaloidy dráždící pokožku a jsou uvolňovány ze sinic rodu *Lyngbya*, *Schizotrix* a *Oscillatoria* (Chorus a Bartram, 1999; Bláha a kol., 2009).

Cytotoxiny, především karcinogenní lyngbyatoxin-a je produkován sinicemi rodu *Lyngbya*, jehož nízké koncentrace způsobují kožní onemocnění (Ongley a kol., 2013).

2.2. Vliv AOM na procesy úpravy vody

Přítomnost AOM v surové vodě způsobuje řadu problémů při její úpravě na vodu pitnou (Henderson a kol., 2010; Matilainen a kol., 2010). V případě vyšších koncentrací ve vodách způsobují AOM poruchy koagulace (Pivokonský a kol., 2006, 2014), ovlivňují koagulaci zákalotvorných příměsí (hlinitokřemičitanů) (Takaara a kol., 2007; Šafaříková a kol., 2013), způsobují zanášení filtračních membrán (Her a kol., 2004), jsou zdrojem vedlejších produktů desinfekce při hygienickém zabezpečení vody chlorem nebo ozonem (Richardson a kol., 2007, 2011), a také negativně ovlivňují organoleptické vlastnosti vody, jedná se o tzv. T&O sloučeniny (Taste and Odor) (Ma a kol., 2012).

Účinnost koagulace AOM je závislá především na zastoupení peptidové/proteinové a sacharidové složky, na podílu hydrofilních látek, na molekulových hmotnostech, potenciálu tvořit rozpustné povrchové ligandové komplexy s kovy, na typu a dávce koagulačního činidla, na hodnotě pH atd. (Pivokonský a kol., 2009, 2012, 2015; Šafaříková a kol., 2013). Řada prací prokázala, že koagulací jsou odstraňovány zejména vysokomolekulární AOM, zatímco účinnost odstranění nízkomolekulárních látek, především peptidů o MW < 10 kDa, je velmi nízká (Bernhardt a kol., 1985; Pivokonský a kol., 2009, 2012, 2015; Ma a kol., 2012; Šafaříková a kol., 2013). Při odstraňování AOM jsou peptidy/proteiny koagulovány s vyšší účinností než polysacharidy (Ma a kol., 2012). Účinnost odstranění peptidů/proteinů dosahuje cca 50-75 %, zatímco u nepeptidové části je účinnost pouze 12-22 % (Pivokonský a kol., 2009). Vyšší účinnost odstranění proteinové složky AOM je dána elektrostatickými interakcemi mezi jejich disociovanými funkčními skupinami (např. hydroxylové, karboxylové, thiolové, aminové) a nabitými produkty hydrolýzy Al/Fe (Pivokonský a kol., 2009, 2012, 2015; Šafaříková a kol., 2013). Nízká účinnost koagulace sacharidové složky AOM je dána především jejich malým povrchovým nábojem, což se projevuje nízkou účinností elektrostatických interakcí (Pivokonský a kol., 2009). Optimální pH pro koagulaci proteinové složky AOM je v rozmezí 4-6 pro železitá koagulační činidla a 5-7 pro činidla hlinitá (Pivokonský a kol., 2012, 2015; Šafaříková a kol., 2013). Při hodnotách pH < 4 a > 8 koagulace AOM peptidů/proteinů již prakticky neprobíhá (Pivokonský a kol., 2012).

Koagulace AOM je vedle elektrostatických interakcí ovlivněna také hydrofilním/hydrofobním charakterem těchto látek. Jak již bylo řečeno výše, mezi

hydrofilní AOM patří především peptidy, proteiny a polysacharidy (Her a kol., 2004; Nguyen a kol., 2005; Pivokonský a kol., 2014). Hydrofobní složka AOM je pak tvořena především uhlovodíky, vysokomolekulárními alkylaminy, vysokomolekulárními alkylkarboxykyselinami a aromatickými kyselinami (Fogg, 1971; Edzwald, 1993).

Obecně platí, že především hydrofilní látky jsou za určitých podmínek obtížně koagulovatelné. Důvodem je skutečnost, že v okolí protonovaných polárních nebo iontových skupin na povrchu těchto látek (např. COOH, OH, SH) vzniká hydratační obal a mezi dvěma hydrofilními povrchy hydratační odpudivé síly (Liang a kol., 2007; Li a kol., 2008). Navíc u hydrofilních molekul znemožňuje tvorba hydratační vrstvy interakci s produkty hydrolýzy Al/Fe činidel a snižuje tak účinnost koagulace. Naproti tomu hydrofobní povrchy látek nenesou žádné polární nebo iontové skupiny, takže afinita látky k vodě neexistuje. Interakce molekul vody s hydrofobním povrchem je entropicky nevýhodná, proto mají hydrofobní látky tendenci se spojovat navzájem (Li a kol., 2008).

Poruchy koagulace AOM jsou také způsobovány tvorbou rozpuštěných povrchových komplexů s hydrolytickými produkty Al/Fe. Tvorba těchto komplexů vede k nárůstu spotřeby koagulačního činidla, případně i k inhibici koagulace jako takové (Pivokonský a kol., 2012).

Vedle koagulace lze především pro odstranění nízkomolekulární složky AOM využít adsorpci na aktivním uhlí (AC – Activated Carbon) (Jurczak a kol., 2005; Newcombe, 2006; Hnaťuková a kol., 2011; Cook a Newcombe, 2012; Kopecká a kol., 2014). Zavedením dalšího stupně úpravy pomocí AC je důležité především v případě malé účinnosti koagulace nízkomolekulárních AOM, protože právě tato nezkoagulovaná část AOM je významným prekursorem vedlejších produktů desinfekce vody. Obdobně jako u koagulace jsou i u adsorpce hlavními mechanismy určujícími její účinnost elektrostatické interakce (Hnaťuková a kol., 2011; Kopecká a kol., 2014). Vedle elektrostatických interakcí se uplatňuje tvorba vodíkových můstků a hydrofobní interakce (Hnaťuková a kol., 2011; Kopecká a kol., 2014). Adsorpce na aktivním uhlí se využívá také pro eliminaci cyanotoxinů (Ho a kol., 2006, 2008, 2011). Práce Hnaťuková a kol. (2011) prokázala, že AOM mají značný inhibiční vliv na adsorpci pesticidů, s kterými soupeří o stejná adsorpční místa na povrchu aktivního uhlí.

Druhým často používaným mechanismem odstranění AOM, včetně cyanotoxinů, s nízkou molekulovou hmotností je mikro- (MF), ultra- (UF) a nanofiltrace (NF) (Zhou a kol., 2014). Membránové filtrace jsou závislé na kvalitě surové vody, a proto se často

používají v kombinaci s konvenční úpravou vody. Použití membrán pro úpravu vod s obsahem fytoplanktonu je výhodné zejména z toho důvodu, že při úpravě nedochází k lyzi buněk s následným uvolněním vyšší koncentrace AOM (Lee a kol., 2006, Campinas a Rosa, 2010). Při samostatném používání membrán velmi často dochází k jejich zanášení složkami AOM, zejména u nano- a ultrafiltrace (Her a kol., 2004). Mezi hlavní látky způsobující zanášení membrán patří proteiny a polysacharidy (Her a kol., 2004; Lee a kol., 2006; Zhang a kol., 2010; Qu a kol., 2012). Tyto vysokomolekulární látky také mohou způsobovat sekundární kontaminaci povrchu filtračních membrán (Schäfer a kol., 1998). Chiou a kol. (2010) zkoumali vliv AOM polysacharidů na zanášení membrán u třech druhů fytoplanktonu, sinice *Microcystis aeruginosa* a řas *Chl. vulgaris* a *Chlorella sp.* Zejména polysacharidové látky v EOM složce, kterých sinice *M. aeruginosa* produkuje více vůči ostatním studovaným řasám, jsou významně zodpovědné za zanášení membrán a snižování toku. Her a kol. (2004) uvádí, že molekuly s MW 1000-5000 Da, s negativním nábojem a vysokou hodnotou SUVA neprošly skrz NF membránu v důsledku elektrostatických repulzí a hmotnostního rozložení AOM. Dále také zjistili, že na zanášení membrán má vliv především charakter AOM, provozní podmínky filtrace a vlastnosti membrán, a že koncentrace AOM ve vodě nemá na provoz membrán zásadní vliv.

2.2.1. Desinfekce vody a tvorba DBPs

Desinfekce pitné vody je zpravidla posledním krokem její úpravy. Má zásadní vliv na kvalitu a zdravotní nezávadnost pitné vody. Při použití silných oxidačních činidel (ozon, chlór, oxid chloričitý a chloraminy) dochází k usmrcení choroboplodných zárodků bakterií a virů (Suknik a kol., 1987; Richardson a kol., 2011). Při tomto hygienickém zabezpečení vod s obsahem AOM vznikají tzv. DBPs (Disinfection By-Products - vedlejší produkty desinfekce vody) a jejich koncentrace ve vodách se pohybují v řádu µg/L (Plummer a Edzwald, 2001; Zhang a Minear, 2004). Do dnešní doby jich bylo identifikováno téměř 700 a jsou původci vážných zdravotních problémů (Richardson a kol., 2007, 2011; Guilherme a Rodriguez, 2014).

Mezi významné DBPs řadíme trihalogenmetany (THMs - Trihalogenmethanes) a halogenderiváty kyseliny octové (HAAs - Haloacetic acids) (Hong a kol., 2008; Huang a kol., 2009; Liu a kol., 2011). Nejznámější THM sloučeninou je chloroform (CHCl_3), u kterého byly prokázány karcinogenní a teratogenní účinky. Vedle něj se ve vodě také nachází neméně významný bromodichlormetan (CHBrCl_2),

chlorodibrommetan (CHBr_2Cl) a bromoform (CHBr_3) (Richardson a kol., 2007, 2011; Palmer a Reason, 2009). Do skupiny HAAs řadíme pět významných sloučenin – kyselinu chloroctovou (CH_2ClCOOH), bromooctovou (CH_2BrCOOH), dichloroctovou (CHCl_2COOH), dibromoctovou (CHBr_2COOH) a trichloroctovou (CCl_3COOH) (Richardson a kol., 2011). Při tvorbě DBPs hrají významnou roli vlastnosti organických látek jako molekulová hmotnost, hydrofobicita, obsah organického dusíku a aromaticita (Hong et al., 2008, Huang a kol., 2009). Tyto vlastnosti jsou ovlivnitelné předoxidací, která tak může ovlivnit vznik DBPs (Xie a kol., 2013). Dalším důležitým faktorem je hodnota pH. Při vyšších hodnotách pH (6-8) vznikají především THMs, zatímco tvorba HAAs je na hodnotě pH téměř nezávislá (Coral a kol., 2013). AOM mají obecně větší potenciál tvořit HAAs než THMs (Hong a kol., 2009; Huang a kol., 2009). Nejvýznamnějšími prekursory tvorby DBPs jsou lipidy, proteiny a aminokyseliny (Hong a kol., 2009). Vedle THMs a HAAs vznikají při desinfekci vody také např. halonitrometany, haloaminy, nitrosaminy (karcinogenní a genotoxický nitrosodimethylamin), halopyroly, aldehydy (karcinogenní a genotoxický formaldehyd, acetaldehyd, chloroacetaldehyd aj.), oxyhalogenidy (karcinogenní bromičnan) a halofuranony (Liu a kol., 2010; Richardson a kol., 2011). V pitné vodě jsou v ČR povoleny maximální koncentrace trihalogenmetanů $100 \mu\text{g/L}$ (Vyhláška MZD 252/2004 Sb.).

Vztah hodnot SUVA k tvorbě DBPs zkoumala studie Hua a kol. (2015). Dospěla k závěru, že se zvyšující se hodnotou SUVA roste koncentrace DBPs ve vodách. Konkrétně při chloraci vody se tvoří převážně THAAs ($R^2 = 0,8$) (TriHaloAcetic Acid – kyselina trihalogenctová) a UTOX ($R^2 = 0,75$) (Unknown Total Organic Halogen – veškeré neznámé organické halogeny). Při použití chloraminů jako desinfekčního činidla je tvorba THM a HAA relativně nízká ($R^2 = 0,2$ a $0,37$), naopak pro tvorbu kyseliny dichloroctové ($R^2 = 0,82$) a UTOX ($R^2 = 0,72$) z hydrofobní frakce je použití chloraminů významné.

Omezení vzniku DBPs lze účinně předcházet maximálním odstraněním organických látek při úpravě vody koagulací, membránovou filtrací či adsorpcí. (Kim a Kang, 2007; Huang a kol., 2009).

2.3. Vybrané mikroorganismy

Z důvodů uvedených v kapitole 2.1.2 byly pro tuto práci vybrány čtyři druhy sladkovodního fytoplanktonu: sinice *Microcystis aeruginosa* a *Merismopedia tenuissima*, rozsivka *Flagilaria crotonensis* a zelená řasa *Chlamydomonas geitleri*.

Microcystis aeruginosa je sladkovodní sinice, která patří do řádu *Chroococcales*. Je významným zástupcem škodlivého vodního květu a producentem neurotoxinů a hepatotoxinů. Uvolňuje také lipopolysacharidy, které dráždí pokožku. Další problémy, vedle těch zdravotních, které bývají spojené s nadměrným výskytem sinic, jsou velké výkyvy pH ve vodách a deoxygenace v důsledku rozkladu buněk (Sellner a kol., 2003). Nachází se ve sladkých eutrofních vodách všech podnebných pásů, vyjma cirkumpolárního (Komárek, 1996). Buňky *Microcystis* jsou kulovité, v průměru mají 4-6 µm a tvoří nepravidelné kolonie někdy patrné i pouhým okem (Chorus a Bartram, 1999). U rodu *Microcystis* se nevyskytuje klidové stádium akinet a přezimování probíhá v sedimentech ve formě hibernujících buněk, které si uchovávají schopnost metabolizace. Buňky obsahují plynové měchýřky, tzv. gas vesicles, které se sdružují do aerotopů a umožňují sinicím pohybovat se ve vodním sloupci (Šejnohová a kol., 2004). Způsob výživy závisí na fázi životního cyklu a je mixotrofní, kdy se střídá fotoautotrofie a heterotrofie. Sinice preferují stálé prostředí, proto jim tedy vyhovují stojaté vody, ve kterých nedochází k častému promíchávání vody. Na vznik sinicového vodního květu má významný vliv počasí na konci jara. Teplé a suché počasí v pozdních jarních měsících vytváří ideální podmínky pro tvorbu masivních vodních květů (Znachor, 2005; Znachor a kol., 2006). V ČR se vodní květ ročně vyskytuje až na 80 % sledovaných vodních nádrží (Bláha a Maršálek, 2003).

Merismopedia tenuissima je autotrofní drobná sinice řadící se do řádu *Chroococcales*, jejíž průměr buněk se pohybuje pouze kolem 1,5 µm, a která rovněž produkuje microcystiny (Komárek, 2003; Mohamed a kol., 2006). Kolonie mají charakteristický plochý deskovitý tvar (Komárek, 2003). Běžně se vyskytují v celém mírném pásu v mezotrofních a eutrofních vodách. Nicméně značné populace se nacházejí také v oblastech švédských oligotrofních jezer (Blomqvist, 2001). Populace sinice se rozvíjejí od druhé poloviny léta v epilimnické vrstvě a přetrvávají i po podzimní cirkulaci v celém hloubkovém profilu. Během zimy je lze nalézt v celém vodním sloupci, kdy jejich počty postupně klesají a minima dosáhnou na konci jara

(Koza a Rederer, 2013). Z toho je patrné vysoká tolerance *M. tenuissima* k teplotě vody a množství slunečního záření, což ji významě odlišuje od druhé studované sinice *Microcystis aeruginosa*. Další odlišností je, že netvoří typické vodní květy na hladině vody, ale nalezneme ji rozptýlenou v celé hlouce nádrže (Koza a Rederer, 2013). Blomqvist (2001) studoval vliv vápnění na výskyt druhu *M. tenuissima* v oligotrofním jezeře (pH 5,6) ve Švédsku. Limitujícím faktorem pro růst sinic je obecně fosfor, ale před vápněním tohoto jezera představoval limitující faktor také dusík. Po vápnění došlo ke zvýšení koncentrace dusíku a naopak ke snížení fosforu, což způsobilo pokles populace *M. tenuissima*. Předpokládá se tedy, že vápnění je výhodné při eliminaci populace druhu sinic *Merismopedia* (Blomqvist, 2001). V posledních několika letech se rod *Merismopedia* pravidelně vyskytuje na vodní nádrži Josefův Důl. *M. tenuissima* zde, spolu s dalším druhem *M. punctata*, způsobila na tehdy jednostupňové úpravě vody Bedřichov značné problémy s úpravou surové vody na vodu pitnou (Koza a Rederer, 2013).

Fragilaria crotonensis je netoxická rozsivka charakteristická tyčinkovitými buňkami, mírně rozšířenými v centrální části, o délce okolo 70 µm a šířce 2-5 µm. Patří do řádu *Fragilariales*, které jsou téměř kosmopolitní. V dnešní době je známo cca 285 druhů a odhaduje se, že tato početná skupina organismu zajišťuje 20-25 % primární produkce na Zemi (Znachor, 2008). Druh *F. crotonensis* je důležitou součástí jarních vodních květů, zvláště v eutrofických jezerech a jejich přítomnost se vyznačuje hnědým zbarvením vody. Při zvýšení teploty na konci jara jsou vytlačovány z fytoplanktonu toxickými sinicemi (Znachor, 2008). *F. crotonensis* vykazuje typický „bloom and bust“ životní cyklus. Pokud jsou podmínky, jako živiny a světlo v epilimniu výhodné, velmi snadno vyhrají v konkurenčním boji a stanou se dominantním druhem vodního květu („bloom“). Při nepříznivých podmínkách v případě vyčerpání živin klesají buňky rozsivky ke dnu („bust“), kde mohou vytvářet klidové spóry (Furnas, 1990). Pro rod *Fragilaria* je typická vysoká koncentrace oxidu křemičitého ve stěnách buňky (Znachor, 2008; Znachor a kol., 2012). Právě využití křemíku je klíčem k jejich ekologickému úspěchu. V případě přítomnosti sloučenin křemíku v koncentraci nad 2 µmol/m³ se stávají dominantním druhem fytoplanktonem (z více jak 70 %) (Egge a Aksnes, 1992).

Chlamydomonas geitleri je fototrofní jednobuněčná zelená řasa s dvěma bičíky patřící do řádu *Chlamydomonadales*. Vedle ostatních zvolených druhů se jedná o eukaryotní organismus, který v průměru měří okolo 10 µm (Žárský a kol., 1985). Rod

Chlamydomonas je široce distribuován po celém světě, jak ve vodě, tak i půdě. Díky své početnosti se jedná o významného primárního producenta hrajícího významnou roli v potravním řetězci (Falciatore, 2005). *Chl. geitleri* je fototrofní organismus nacházející se ve sladkých vodách. V letních měsících tvoří společně s jinými druhy (např. *M. aeruginosa*) typické zelené vodní květy. Tento druh sice neprodukuje toxické látky, ale ve vyšších koncentracích zalepuje rybám žábry a tvoří velké zapáchající nánosy buněk u břehů vodních ploch (Internet 1).

3. Materiál a metodika

3.1. Druhy řas

Axenická kultura *M. aeruginosa* (kmen Zap. 2006/2) a *Chl. geitleri* (kmen Ettl. 1982/3) byla dodána z Botanického ústavu - Akademie věd ČR, Praha, *F. crotonensis* (kmen SAG 28,96) z Culture Collection, Experimental Phycology and Culture Collection of Algae at the University of Goettingen, Německo a *M. tenuissima* (kmen NIES-230) z National Institute for Environmental Studies, Japonsko.

3.2. Kultivace

Kultury *M. aeruginosa* a *Chl. geitleri* byly kultivovány při teplotě 20 °C a cyklu 16 hodin světlo/8 hodin tma ve WC médiu (Guillard a Lorenzen, 1972). *F. crotonensis* byla pěstovaná v Jaworského médiu (Andersen, 2005) při teplotě 15 °C a světelném režimu 12 hodin světlo/12 hodin tma. Pro *M. tenuissima* byl použit živný roztok C, teplota 20 °C a světelný cyklus 12 hodin světlo/12 hodin tma (Ichimura, 1971). Jednotlivé složení médií je uvedeno v tabulce 1.

Organismy byly nejprve kultivovány v Erlenmayerových baňkách, kde byly kontinuálně promíchávány na laboratorních třepáčkách (Heidolph, Německo) rychlostí 10 rpm. Po dosažení vhodného objemu kultury (2-3 L) byly organismy převedeny do kultivačních nádob o objemu 20 L. Hodnoty pH byly monitorovány kontinuálně a udržovány automatickým dávkováním CO₂ (Linde Gas, Česká republika) na hodnotě pH 7,5. Jako zdroj světla byly použity zářivky Sun Glo (Hagen, Německo) o celkové svítivosti 2400 luxů.

Kultivační média byla sterilizována při teplotě 121 °C po dobu 15 min, skleněné nádoby pak při teplotě 134 °C po dobu 3 min v autoklávu (Tuttnauer, Izrael).

3.3. Monitoring průběhu kultivace

Růst mikroorganismů byl monitorován denně pomocí počítačí komůrky (typ Cyrus I.) pod optickým mikroskopem (Intraco Micro, Česká republika). Zároveň bylo prováděno měření optické hustoty (Optical Density – OD) v 1 cm kyvetě pomocí UV/VIS 8453A spektrofotometru (Agilent Technologies, USA) v adsorpčních maximech odpovídajících jednotlivým kultivovaným druhům, 675 nm pro *M. aeruginosa*, 683 nm pro *M. tenuissima*, 560 nm pro *F. crotonensis* a 720 nm pro *Chl. geitleri*.

Tabulka 1: Složení kultivačních médií

WC médium	Jaworského médium	C médium
36,8 g/L CaCl ₂ .2H ₂ O	20 g/L Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,15 g/L Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O
37 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O	12,4 g/L KH ₂ PO ₄	0,1 g/L KNO ₃
12,6 g/L NaHCO ₃	50 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g/L β-Glycerofosfát.5H ₂ O
5,7 g/L K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	15,9 g/L NaHCO ₃	0,04 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O
42,5 g/L NaNO ₃	2,25 g/L EDTAFeNa	0,75 g/L Na ₂ EDTA
21,2 g/L Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	2,25 g/L EDTANa ₂	97 mg/L FeCl ₃ .6H ₂ O
4,36 g/L Na ₂ EDTA	2,48 g/L H ₃ BO ₃	41 mg/L MnCl ₂ .4H ₂ O
3,15 g/L FeCl ₃ .6H ₂ O	1,39 g/L MnCl ₂ .4H ₂ O	5 mg/L ZnCl ₂
0,01 g/L CuSO ₄ .5H ₂ O	1 g/L (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	2 mg/L CoCl ₂ .6H ₂ O
0,022 g/L ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,04 g/L cyanocobalamin	4 mg/L Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
0,01 g/L CoCl ₂ .6H ₂ O	0,04 g/L thiamin HCl	1 µg/L thiamin HCl
0,180 g/L MnCl ₂ .4H ₂ O	0,04 g/L biotin	0,01 µg/L biotin
0,006 g/L Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	80 g/L NaNO ₃	0,01 µg/L cyanocobalamin
1 g/L H ₃ BO ₃	36 g/L Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,5 g/L pufr TRIS
0,1 g/L thiamin HCl		
0,5 mg/L biotin		
0,5 mg/L cyanocobalamin		
0,115 g/L pufr TRIS		

Dalším parametrem pro sledování průběhu kultivace byla koncentrace chlorofylu-a. Vzorek kultury (100 mL) byl zfiltrován přes 0,22 µm membránový filtr (Millipore, USA), který byl extrahován v 90% etanolu (14 mL) ve vodní lázni při teplotě 75 °C po dobu 5 minut. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byla u vzorku proměřena absorbance při vlnové délce 665 a 750 nm na UV/VIS 8453A spektrofotometru (Agilent Technologies, USA). Jako referenční (slepý) vzorek byl použit 90% etanol (Sigma Aldrich, USA). Vzorek byl posléze okyselen (0,01 mL 3M HCl), a opět byla proměřena absorbance vzorku při 665 a 750 nm. Koncentrace chlorofylu-a byla stanovena na základě rovnice 1.

$$\text{Chl-a} = 29,6 * (A - A_a) * [v/(V * d)], \quad (1)$$

kde hodnota A ($A_{665} - A_{750}$) je rozdíl absorbancí před okyselením a A_a ($A_{a665} - A_{a750}$) je rozdíl absorbancí po okyselení HCl, v vyjadřuje objem extraktu (mL), V objem zfiltrovaného vzorku (L), d délku kyvety (cm). Výsledky jsou uvedeny v $\mu\text{g/L}$. Měření byla prováděna 3x a chyba měření byla do 5 %.

3.5. Charakterizace AOM

Obsah extracelulárních organických látek z metabolických pochodů (EOM) byl sledován ve filtrovaném vzorku (0,22 μm membránový filtr, Millipore, USA) jako veškerý rozpuštěný organický uhlík (DOC_T – Dissolved Organic Carbon) pomocí TOC-V analyzátoru (Shimadzu, Japonsko). DOC byl vypočten jako rozdíl celkového uhlíku (TC – Total Carbon) a anorganického uhlíku (IC – Inorganic Carbon) podle rovnice 2.

$$\text{DOC} = \text{TC} - \text{IC} \quad (2)$$

Přístroj byl před měřením kalibrován pomocí hydrogenftalátu draselného (TC standard), hydrogenuhličitanu sodného (TC standard) a bezvodého uhličitanu sodného (IC standard). Měření byla prováděna vždy 3x a jejich chyba byla pokaždé menší než 2 %.

3.5.1. SUVA

Specifická UV absorbance (SUVA) byla stanovena jako podíl absorbance filtrovaného vzorku (0,22 μm membránový filtr, Millipore, USA) při 254 nm (UV-VIS 8453A spektrofotometru, Agilent Technologies, USA) a koncentrace DOC (mg/L) (TOC-V analyzátor, Shimadzu, Japonsko) podle rovnice 3.

$$\text{SUVA} = \text{UV}_{254} / \text{DOC} \quad (3)$$

3.5.2. Příprava EOM

EOM byly od média odděleny filtrací suspenze přes 0,22 μm filtr (Millipore, USA). Následně byla provedena filtrace přes kolonu naplněnou iontově výměnnou pryskyřicí Dowex 50-WX-8 (Sigma Aldrich, USA), kdy byly troj- a dvojmocné kationty (Fe^{3+} , Mg^{2+} atd.) nahrazeny jednomocnými kationty Na^+ . Vzniklý eluát byl desetinásobně zahuštěn na rotační vakuové odparce (Laborota 4000 HB/G1, Německo) při 20 °C. Takto získané vzorky sloužily k dalším analýzám.

3.5.3. Příprava COM

Přefiltrováním kultury mikroorganismů přes 0,22 µm filtr (Millipore, USA) byly získané separované buňky smíchány s demineralizovanou vodou a destruovány v ledové lázni ultrazvukem (UP400S, Hilscher Ultrasonics, Německo) po dobu 5 minut při výkonu 240 W a frekvenci 20 kHz. Zbytky buněk byly od COM odstraněny pomocí membránového filtru 0,22 µm (Millipore, USA). Následně byl filtrát zakoncentrován při 20 °C na rotační vakuové odparce (Laborota 4000 HB/G1, Německo) a připraven k dalším analýzám.

3.5.4. Stanovení podílu peptidové/proteinové složky

Izolace peptidů/proteinů byla provedena dvoustupňovým srážením 25 mL vzorku EOM či COM pomocí (NH₄)₂SO₄ při 0 °C (Dawson a kol., 1986). Vzniklá sraženina peptidů/proteinů byla oddělena filtrací přes 0,22 µm membránový filtr (Millipore, USA) a následně byla rozpuštěna ve 25 mL demineralizované vody. Ze získaného roztoku peptidů/proteinů byly odstraněny zbylé znečišťující látky (zbytky srážecí soli) pomocí ultrafiltrační membrány PLAC 1000 kDa (Millipore, USA) na filtrační aparatuře s míchanou filtrační celou (Solvent Resistant Stirred Cell) (Millipore, USA).

Peptidová/proteinová složka vyjádřená jako rozpuštěný organický uhlík peptidových/proteinových látek (DOC_P) byla stanovena z rozdílu celkového rozpuštěného uhlíku (DOC_T) a koncentrace DOC nepeptidové složky (DOC_{NP}) získané filtrací přes 0,22 µm membránový filtr (Millipore, USA) od sraženiny peptidů/proteinů.

$$\text{DOC}_P = \text{DOC}_T - \text{DOC}_{NP} \quad (4)$$

Stanovení peptidové/proteinové složky bylo provedeno pokaždé 3x s chybou stanovení vždy do 5 %.

3.5.5. Stanovení hydrofobních/hydrofilních frakcí

U vzorků AOM o objemu 250 mL byla upravena hodnota pH pomocí 2 M HCl na pH 2. Vzorky byly kontinuálně protékány dvěma kolonami o průměru 15 mm zapojenými do série a naplněnými 50 mL neiontovou pryskyřicí Supelite DAX-8 (Sigma Aldrich, USA), nebo Amberlite XAD-4 (Sigma Aldrich, USA). Koncentrace jednotlivých frakcí byly změřeny jako rozdíl DOC před a po adsorpci. Frakce

zachycené na pryskyřicích byly z kolony vymyty v obráceném směru pomocí 150 mL 0,1 M NaOH při průtoku 1 mL/min.

3.5.6. Molekulové hmotnosti organických látek

V průběhu exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) fáze růstu mikroorganismů byly sledovány molekulové hmotnosti (Molecular Weight – MW) organických látek. Vzorky EOM *M. aeruginosa* byly odebírány 10. a 18. den, u *M. tenuissima* 10. a 20. den a u *F. crotonensis* a *Chl. geitleri* byly EOM odebírány 8. a 16. den kultivace v EXP respektive STAT fázi růstu. Pro charakterizaci COM vzorků všech kultur obsahující intracelulární organické látky (Intracellular Organic Matter – IOM) byly vzorky odebírány 20. den růstu.

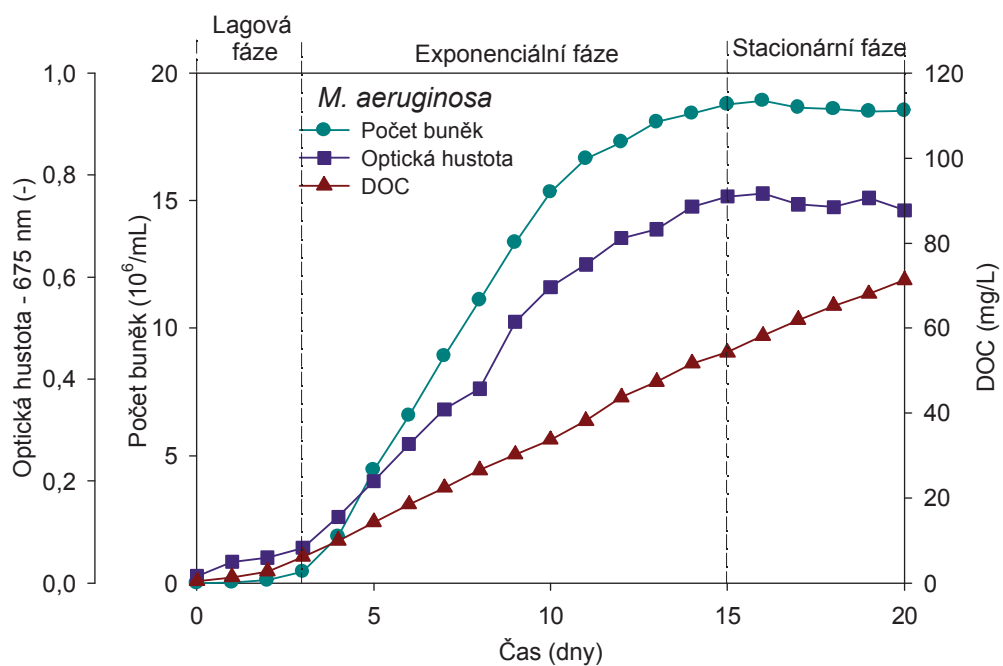
Jednotlivé velikostní frakce byly získány centrifugací (4000 rpm, $T = 40$ min) v ledové lázni pomocí Amicon Ultra-15 odstředivých filtrů o 100, 50, 30, 10, 3 NMWL a 1 kDa PLAC ultrafiltrační membrány (Millipore, USA). Bylo tak dosaženo rozdělení EOM, resp. COM do MW frakcí o >100 , 50–100, 30–50, 10–30, 3–10, 1–3 a <1 kDa.

Relativní molekulové hmotnosti peptidových/proteinových látek byly zjišťovány dále pomocí HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) na systému HPLC (Agilent Technologies, USA) s DAD (Diode Array Detector) a Agilent Bio SEC-5 100 Å, 300 Å a 500 Å ($7,8 \times 300$ mm, 5 μ m) kolonami zapojenými do série (separační rozsah 100–1 250 000 Da). Byla sledována absorbance vzorku při vlnové délce 280 nm, která představuje adsorpční maximum proteinových látek (Pivokonský a kol., 2006). Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr o koncentraci 0,15 M Na_2HPO_4 (pH 7) při průtoku kolonou 1 mL/min a teplotě detektoru 23 °C. Molekulové hmotnosti zjišťovaných peptidů/proteinů byly odvozeny z kalibrační křivky SEC standardů o známých molekulových hmotnostech (Sigma Aldrich, USA): cyanokobalamin (1,35 kDa), karboanhydráza (29 kDa), alkohol dehydrogenáza (150 kDa), apoferritin (443 kDa), thyroglobulin (670 kDa) a imunoglobulin (900 kDa). Pro výpočet MW byla zkonstruována kalibrační křivka ($R^2 = 0,99$). Odchyłky MW při měřeních byly vždy do 3 %.

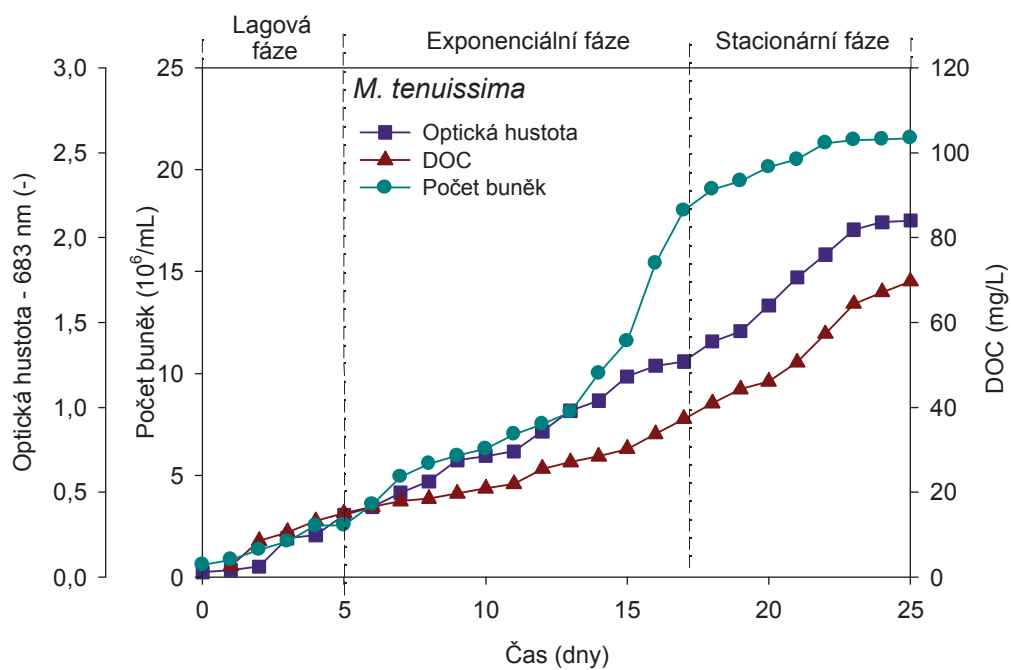
4. Výsledky a diskuse

4.1. Růst fytoplanktonu

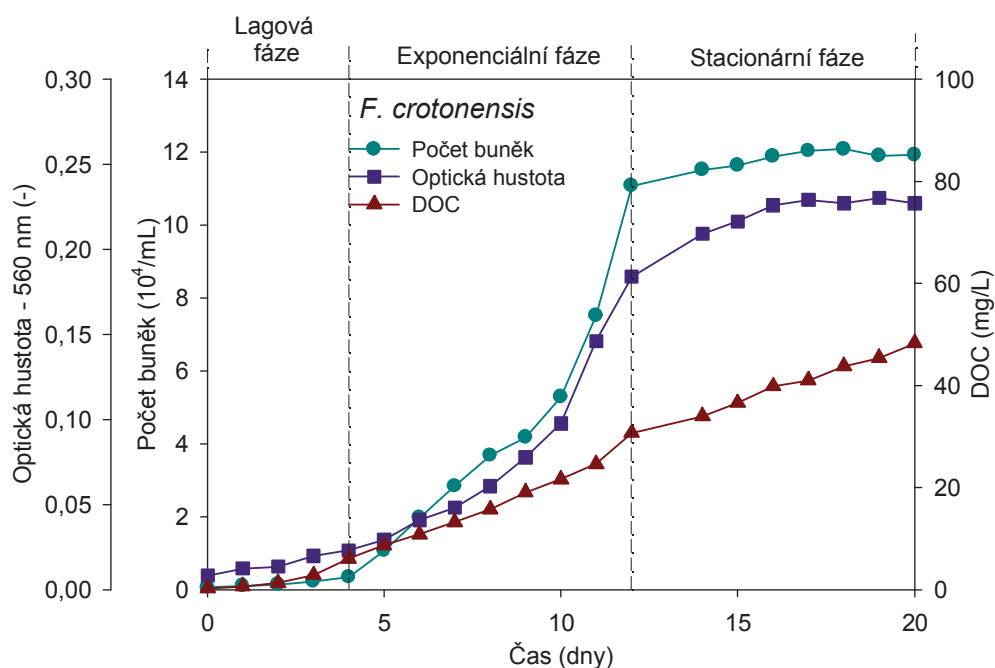
Růstové křivky sinic *Microcystis aeruginosa* a *Merismopedia tenuissima*, rozsivky *Fragilaria crotonensis* a zelené řasy *Chlamydomonas geitleri* jsou znázorněny na obr. 2a-d, kde je koncentrace vyprodukovaných organických látek vyjádřena jako DOC_T. Růst všech čtyř organismů je rozdělen na tři fáze: lagovou, exponenciální a stacionární. Lagová fáze trvala u všech organismů maximálně 5 dní. Doba trvání exponenciální fáze, při které docházelo k prudkému nárůstu populace, se u každého druhu lišila. U sinic *M. aeruginosa* a *M. tenuissima* trvala 12 dní, u rozsivky *F. crotonensis* pouze 8 dní a u zelené řasy *Chl. geitleri* 10 dní. Délka stacionární fáze byla u vybraných organismů také rozdílná. Sinice *M. tenuissima* vykazuje delší stacionární fázi (8 dní) než druhá sinice *M. aeruginosa* (5 dní). U *F. crotonensis* a *Chl. geitleri* trvala stacionární fáze 8 a 7 dní. Kultivací sinice *M. aeruginosa* a *Anabaena flos-aqua* a zelené řasy *Scenedesmus quadricauda* se zabývala studie Pivokonský a kol. (2006). Konkrétně pro *M. aeruginosa* byla lagová fáze 2 dny, exponenciální fáze 8 dní a stacionární fáze 10 dní, pro *A. flos-aqua* byly výsledky velmi podobné s *M. aeruginosa*, a to 4 dny pro lagovou fázi, 8 dní pro exponenciální fázi a 10 dní pro stacionární fázi. Fáze pro *S. quadricauda* byly 4 dny pro lagovou, 6 dní pro exponenciální a 14 dní pro stacionární fázi. Práce Yang a kol. (2011) kultivovala sinici *M. aeruginosa* a zelenou řasu *Chlorella vulgaris*, kultivační křivky obou organismů měly déle trvající růstové fáze. Konkrétně pro *M. aeruginosa* 4 dny v lagové fázi, 18 dní v exponenciální a 11 dní ve stacionární fázi a pro *Chlorella vulgaris* 10 dní v lagové fázi, 12 dní v exponenciální fázi a 7 dní ve stacionární fázi. Leloup a kol. (2013) zkoumali sinici *M. aeruginosa* a řasu *Euglena gracilis*. Pro oba druhy trvala lagová fáze 5 dní, exponenciální fáze přibližně 14 dní a ve stacionární fázi se již lišily, konkrétně u *M. aeruginosa* trvala stacionární fáze 14 dní a u *Euglena gracilis* dokonce 34 dní. Zmíněné rozdíly v jednotlivých fázích u Yang a kol. (2011) a Leloup a kol. (2013) jsou pravděpodobně zapříčiněny rozdílnými kultivačními podmínkami (světelný režim, volba média a teplota) a kondicí kultivované kultury.



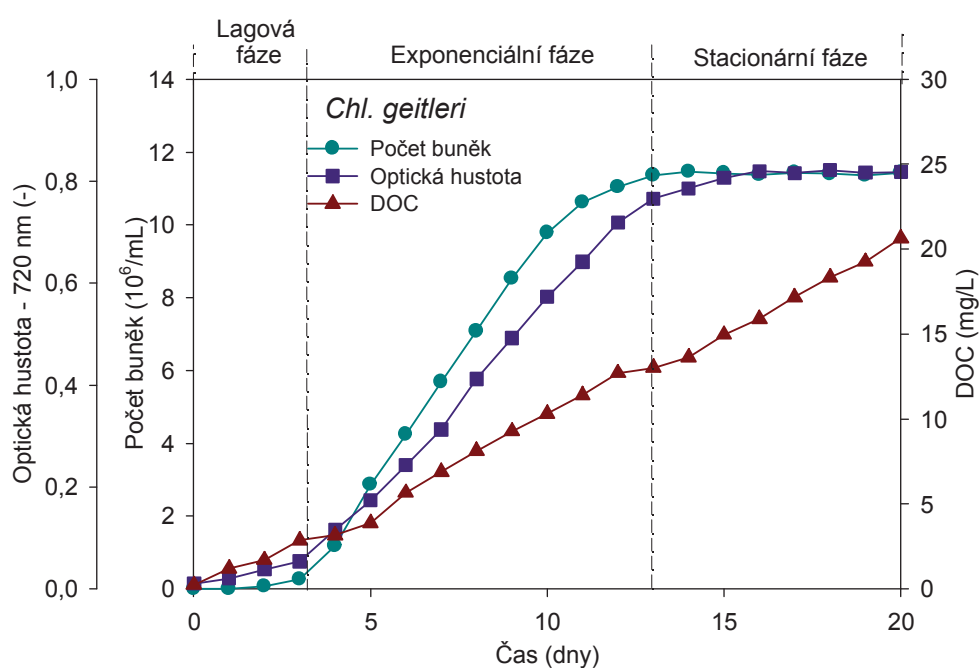
Obr. 2a Růstová křivka pro *M. aeruginosa*



Obr. 2b Růstová křivka pro *M. tenuissima*



Obr. 2c Růstová křivka pro *F. crotonensis*



Obr. 2d Růstová křivka pro *Chl. geitleri*

Dále je z obr.2a-d patrné, že na rozdíl od počtu buněk a optické hustoty rostla koncentrace organických látek (DOC_T) téměř lineárně. U obou sinic je maximální hodnota DOC velmi podobná, u *M. aeruginosa* dosahuje 71 mg/L a 73 mg/L u *M. tenuissima*. U *Chl. geitleri* je maximální DOC několikanásobně nižší a dosahuje jen 21 mg/L. Kultura *F. crotonensis* dosáhla maximální koncentrace DOC 48 mg/L.

Pivokonský a kol. (2006) dospěli k podobným hodnotám DOC u sinic *M. aeruginosa* a *Anabaena flos-aqua* a zelené řasy *Scenedesmus quadricauda*. Maximální DOC_T u *M. aeruginosa* uvádí 67 mg/L, zatímco pro druhou sinici *A. flos-aqua* pouze 36 mg/L. Nejnižší hodnotu DOC, a to 19,7 mg/L, zjistili u *S. quadricauda*. Zejména hodnoty pro *M. aeruginosa* a *S. quadricauda* korespondují s výsledky obou zkoumaných sinic a zelené řasy, které byly vybrány pro tuto práci. Naopak studie Yang a kol. (2011) a Leloup a kol. (2013) uvádí odlišné hodnoty DOC_T . Yang a kol. (2011) dospěla ve stacionární fázi k hodnotám 5,9 mg/L pro sinici *Microcystis aeruginosa* a pro řasu *Chlorella vulgaris* 4,6 mg/L. Leloup a kol. (2013) uvádí hodnoty pro *M. aeruginosa* 21,6 mg/L a pro řasu *E. gracilis* 49,4 mg/L. Rozdílné hodnoty DOC jsou zřejmě způsobeny rozdílnými kultivačními podmínkami, jako je volba média, teploty a světelného režimu. Některé druhy fytoplanktonu mohou preferovat kultivaci v laboratorních podmínkách v menších objemech (do 1 L), za to jiným druhům mohou vyhovovat velkoobjemové kultivace (např. 20 L). Během exponenciální fáze je DOC_T tvořeno převážně EOM. Ve stacionární fázi, kdy růst populace stagnuje, se koncentrace DOC_T zvyšuje díky uvolňování COM z protoplazmy vlivem postupného odumírání buněk (Pivokonský a kol., 2014).

Optická hustota na grafech 2a-d je využívána pro jednoduché zjištění koncentrace buněk. Každý organismus vykazuje absorpční maximum při jiné vlnové délce. Pro *M. aeruginosa* činí hodnota vlnové délky absorpčního maxima 675 nm, pro *M. tenuissima* 683 nm, pro *F. crotonensis* 560 nm a pro *Chl. geitleri* 720 nm. U každého mikroorganismu vykazuje křivka OD stejný trend s dvěma inflexními body, které značí přestup do jiné růstové fáze. První inflexní bod nastal během 4. nebo 5. dne růstu a odpovídá přechodu kultury z lagové do exponenciální fáze. Druhý inflexní bod se na růstové křivce jednotlivých organismů objevil v rozmezí mezi 12. - 17. dnem kultivace, konkrétně 15. den u *M. aeruginosa*, 17. den u *M. tenuissima*, 12. den u *F. crotonensis* a 14. den u *Chl. geitleri* a znamenal přechod kultur z fáze exponenciální do fáze stacionární. Leloup a kol. (2013) zjistili obdobná absorpční maxima. Pro zelenou řasu *Euglena gracialis* bylo zjištěno absorpční maximum 685 nm a pro sinici *Microcystis aeruginosa* 750 nm.

Celkový počet buněk obou sinic a zelené řasy dosahuje podobných hodnot znázorněných na grafech 2a-d. Zde jsou také patrné dva inflexní body, které stejně jako u optické hustoty značí ve stejné dny přechody mezi jednotlivými fázemi růstu. Maximální počet buněk sinice *M. aeruginosa* je na konci stacionární fáze $18,6 \times 10^6$

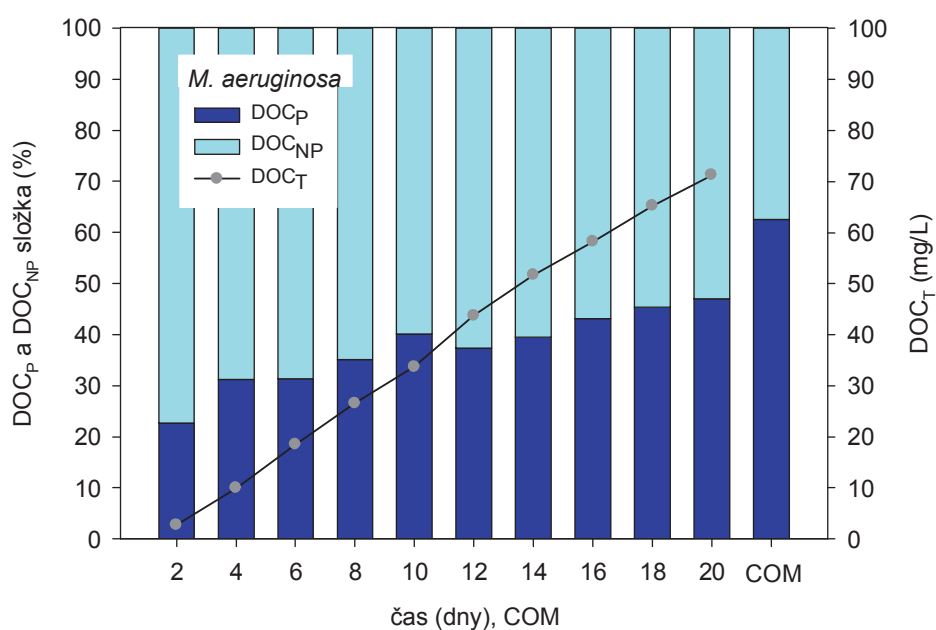
buněk/mL, u *M. tenuissima* $21,5 \times 10^6$ buněk/mL a u *Chl. geitleri* $11,4 \times 10^6$ buněk/mL. U rozsivky *F. crotonensis* je celkový počet buněk nižší než u ostatních organismů, a to $11,9 \times 10^4$ buněk/mL. To je zřejmě způsobeno obtížnější tvorbou buněk s křemičitou schránkou. Nejvyššího počtu buněk dosahuje sinice *M. tenuissima* patrně z důvodu své malé velikosti (3 μ m), rozptýlenosti v celém objemu nádoby (netvoří vodní květ) a v neposlední řadě také z důvodu odolnosti vůči teplotním a světelným změnám. V přírodě se běžně vyskytuje ve vodách od 4 °C v zimním období, až po prohřáté epilimnické vrstvy nádrží v letních měsících. Leloup a kol. (2013) uvádí podobný maximální počet buněk sinice *M. aeruginosa* $11,8 \times 10^6$ buněk/mL. Naopak pro řasu *E. gracialis* je tato hodnota o řád nižší vůči zelené řase *Chl. geitleri*, a to $4,2 \times 10^5$ buněk/mL. Tyto rozdílné počty buněk pak odpovídají i rozdílné produkci organických látek DOC. Je zřejmé, že růst organismů a množství uvolněného DOC závisí na druhu fytoplanktonu a kultivačních podmínkách. Množství sinic je oproti rozsivkám řádově vyšší, snadněji se množí a produkují větší množství organických látek v porovnání s ostatními studovanými druhy.

4.2. Peptidová/proteinová a neproteinová složka

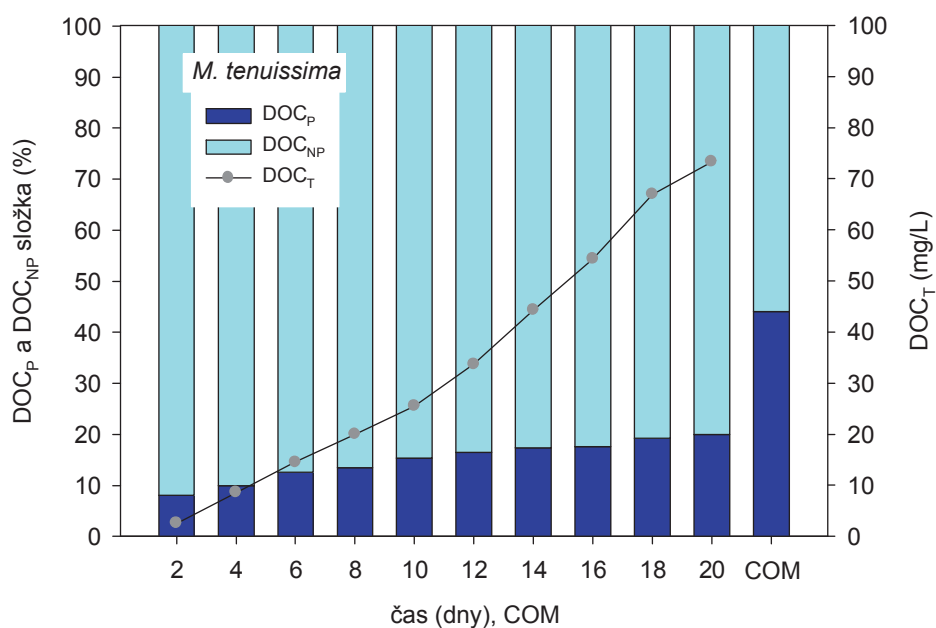
Podíl peptidové/proteinové (DOC_P) a neproteinové (DOC_{NP}) složky z celkové koncentrace organických látek DOC_T uvolňovaných do kultivačního média je zobrazen na obr. 3a-d. Z grafů je patrný postupný nárůst peptidové/proteinové složky během kultivace, a to u všech studovaných mikroorganismů. Ve 20. dnu kultivace dosáhla peptidová/proteinová složka u *M. aeruginosa* 47 % z celového DOC_T , u *M. tenuissima* 20 %, u *F. crotonensis* 42 % a 28 % u *Chl. geitleri*. Vyšší obsah peptidové/proteinové složky ve stacionární fázi oproti exponenciální je způsoben uvolňováním celulárních organických látek (COM) při odumírání buněk. Nárůst obsahu peptidů/proteinů ve stacionární fázi byl zjištěn i ve studii Pivokonský a kol. (2006). Maximální hodnoty u Pivokonského a kol. (2006) byly pro obě sinice *Microcystis aeruginosa* a *Anabaena flos-aqua* 41 % (27,6 mg/L a 15,1 mg/L) a pro řasu *Scenedesmus quadricauda* 22 % (4,4 mg/L). Tyto hodnoty významně korespondují se hodnotami pro sinici *M. aeruginosa* a řasu *Chl. geitleri* zvolenými pro tuto práci. Trend zvyšování množství peptidů/proteinů během růstu organismu potvrzují také práce Henderson a kol. (2008) a Huang a kol. (2012).

Z obr. 3a-d je patrné, že podíl peptidů/proteinů v COM složce je vyšší než v EOM složce. Nejvyšší podíl COM peptidů/proteinů byl zjištěn u sinice *M. aeruginosa*

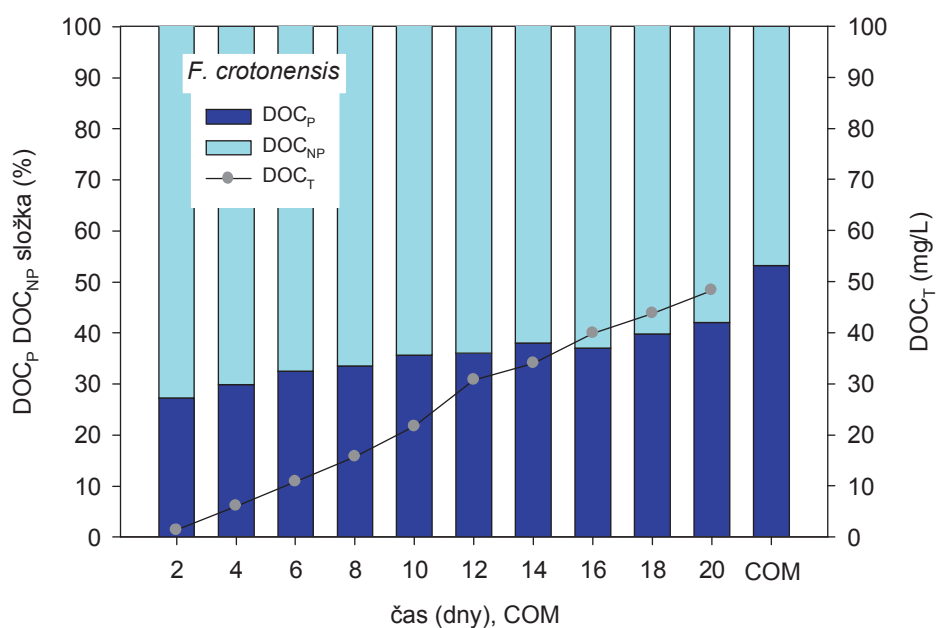
(63%). Naproti tomu u sinice *M. tenuissima* byl tento podíl menší, jen 44 %. U *F. crotonensis* byla peptidová/proteinová část 53 % a pro *Chl. geitleri* pouze 33 %. Zjištěné podíly COM peptidů/proteinů odpovídají i studiím Pivokonský a kol. (2006) a Fang a kol. (2010). Pivokonský a kol. (2006) uvádí podíl COM peptidů/proteinů pro sinice *M. aeruginosa* a *A. flos-aquae* 66,4 %, respektive 50,7 % a 29,1 % pro zelenou řasu *S. quadricauda*, což odpovídá hodnotám uvedeným v této práci. Studie Fang a kol. (2010) uvádí, že IOM (Intracellular Organic Matter) sinice *M. aeruginosa* jsou bohatší na dusíkaté vysokomolekulární sloučeniny oproti EOM složce. Hodnoty pro celulární složku jsou 230 $\mu\text{g N/mg DOC}$ a pro extracelulární složku 180 $\mu\text{g N/mg DOC}$. To odpovídá skutečnosti, že COM má vyšší podíl peptidů a proteinů, které obsahují primární (NH_2), případně sekundární (NH) amino skupinu.



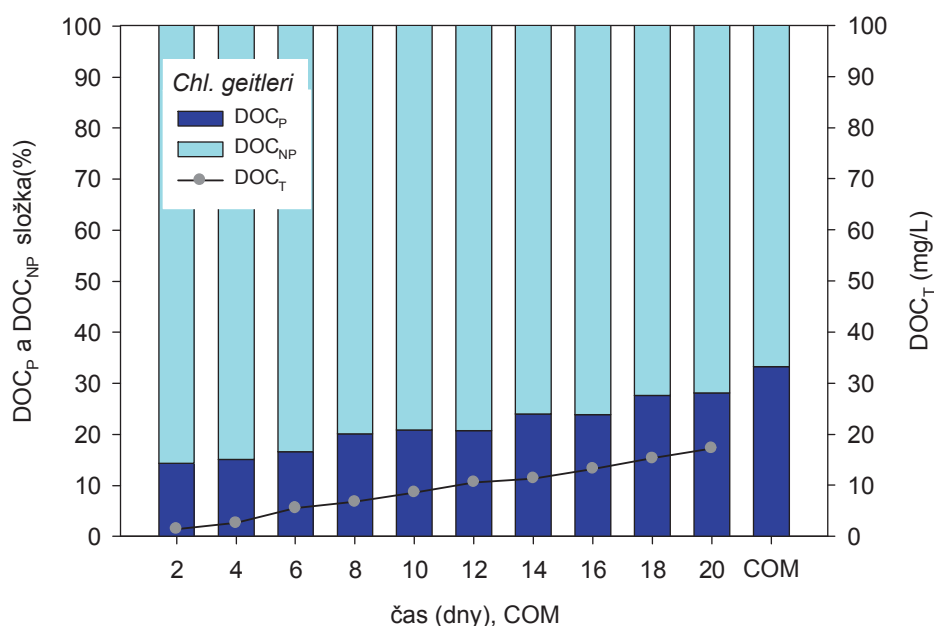
Obr. 3a Podíl peptidové/proteinové (DOC_P) a nepeptidové (DOC_{NP}) složky AOM z celkového množství produkovaných organických látek (DOC_T) v závislosti na času kultivace a pro COM složku *Microcystis aeruginosa*



Obr. 3b Podíl peptidové/proteinové (DOC_P) a nepeptidové (DOC_{NP}) složky AOM z celkového množství produkovaných organických látek (DOC_T) v závislosti na času kultivace a pro COM složku *Merismopedia tenuissima*



Obr. 3c Podíl peptidové/proteinové (DOC_P) a nepeptidové (DOC_{NP}) složky AOM z celkového množství produkovaných organických látek (DOC_T) v závislosti na času kultivace a pro COM složku *Fragilaria crotonensis*



Obr. 3d Podíl peptidové/proteinové (DOC_P) a nepeptidové (DOC_{NP}) složky AOM z celkového množství produkovaných organických látek (DOC_T) v závislosti na času kultivace a pro COM složku *Chlamydomonas geitleri*

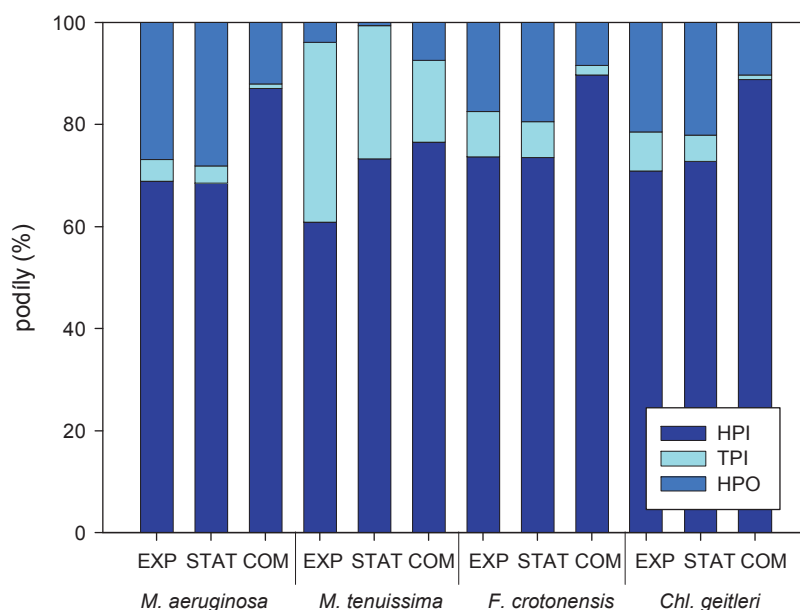
Koagulací COM peptidů/proteinů se zabývaly studie Pivokonský a kol. (2012, 2015) a Šafaříková a kol. (2013). Ty prokazují, že peptidy a proteiny sinice *M. aeruginosa* mohou být díky jejich amfoternímu charakteru a vysokému počtu funkčních skupin lépe odstraněny koagulací než sacharidové, respektive polysacharidové, COM. Za výhodných podmínek, zejména hodnot pH, mohou sinicové proteiny dokonce podporovat proces koagulace (Šafaříková a kol., 2013; Pivokonský a kol., 2015). U peptidové/proteinové složky bylo zjištěno optimum pro maximální účinnost odstranění u železitého koagulantu při hodnotách pH 4-6 nebo u hlinitého koagulantu při pH 5-6,5. Při těchto hodnotách pH se začne uplatňovat mechanismus nábojové neutralizace mezi peptidy/proteiny a Al/Fe-polyhydroxokomplexy (Pivokonský a kol., 2012).

4.3. Hydrofilní a hydrofobní frakce

Podíly hydrofilních (HPI – Hydrophilic), hydrofobních (HPO – Hydrophobic) a trasfilních látek (TPI – Transphilic) obsažených v EOM a COM jsou pro jednotlivé druhy mikroorganismů znázorněny na obr. 4.

Bylo zjištěno, že AOM všech studovaných organismů mají ve všech růstových fázích převážně hydrofilní charakter. HPI frakce extracelulární složky během exponenciální a stacionární fáze růstu představovala cca 61-74 % podíl všech organických látek, HPO 17-35 % a TPI 1-8 % vždy v závislosti na druhu mikroorganismu. Pozoruhodná je skutečnost, že u sinice *M. tenuissima* zastupovala TPI frakce celých 30 %, tedy prakticky o řád větší podíl ve srovnání se zbylými kultivovanými mikroorganismy. Prezentované výsledky korespondují s dalšími studiemi (Henderson a kol., 2008; Li a kol., 2012; Leloup a kol., 2013). Henderson a kol. (2008) zjistili, že podíl HPI frakce u sinice *M. aeruginosa* v exponenciální fázi je 59 % a ve stacionární 57 % a HPO frakce v exponenciální fázi 24 % a ve stacionární fázi 30 %. U zelené řasy *Chlorella vulgaris* byly hodnoty HPI frakce vyšší – 60 % v exponenciální fázi a 71 % ve stacionární fázi. Naopak hydrofobní část v exponenciální části tvořila u zelené řasy 22 % a ve stacionární pouze 11 %. Pro rozsivku *Asterionella formosa* jsou hodnoty HPI frakce v exponenciální fázi 73 % a ve stacionární 70 %. Hydrofobní část je zastoupena z 15 % v exponenciální fázi a z 20 % ve stacionární fázi. U další rozsivky *Melosira sp.* byl podíl HPI a HPO frakce stanoven pouze ve stacionární fázi, a to konkrétně 64 % a 32 % (Henderson a kol., 2008). Podle studie Li a kol. (2012) představovaly jednotlivé frakce extracelulární složky *M. aeruginosa* 63 % HPI, 31 % HPO a 6 % TPI. Práce Leloup a kol. (2013) uvádí, že HPI frakce u sinice *M. aeruginosa* a řasy *Euglena gracilis* tvořila v exponenciální fázi 75 % a ve stacionární u *M. aeruginosa* 61 % a 69 % u *E. gracilis*. Hydrofobní frakce byla zastoupena u *M. aeruginosa* z 2 % v exponenciální fázi a z 20 % ve stacionární fázi. U *E. gracilis* tvořila HPO frakce v exponenciální části 15 % a ve stacionární 18 %. Transfilní frakce zaujímala u studovaných organismů také významnou složku, konkrétně u *M. aeruginosa* a *E. gracilis* v exponenciální fázi 23 % a 10 % a ve stacionární fázi 19 % a 13 %.

U COM představovala hydrofilní frakce 87 % pro *M. aeruginosa*, 77 % pro *M. tenuissima*, 89 % pro *Chl. geitleri* a 90 % pro *F. crotonensis*. Hydrofobní složka byla tvořena u *M. aeruginosa* z 12 %, z 16 % pro *M. tenuissima*, pro *Chl. geitleri* z 10 % a pro *F. crotonensis* z 8 %. Transilní frakce zaujímala nejmenší zastoupení, a to pro *M. aeruginosa* a *Chl. geitleri* pouze 1 %, a pro *F. crotonensis* 2%. Naopak pro *M. tenuissima* TPI tvořila 16 % z celkového množství COM. Tyto výsledky jsou srovnatelné s prací Li a kol. (2012), kde HPI frakce COM složky sinice *M. aeruginosa* tvořila 86 %, HPO 9 % a TPI frakce 5 %.



Obr. 4 Hydrofilní (HPI), transfilní (TPI) a hydrofobní (HPO) frakce EOM v exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) růstové fázi a u COM

Označení jednotlivých sloučenin za hydrofobní či hydrofilní látky je problematické. Někteří autoři (Li a kol., 2012) zařazují peptidy/proteiny do hydrofilní části. Někteří autoři (Edzwald, 1993; Henderson a kol., 2008) však peptidy/proteiny považují za hydrofobní látky, což s ohledem na polární charakter proteinových funkčních skupin je velmi problematické tvrzení. Nicméně zůstává pravdou, že AOM peptidy a proteiny jsou tvořeny jak hydrofilními aminokyselinami (kyselina glutamová a asparagová, lyzin a arginin), tak i aminokyselinami hydrofobními (alanin, tryptofan, leucin, fenylalanin a valin) (Creighton, 1993). Přítomnost peptidů/proteinů sinice *M. aeruginosa* v HPI i HPO frakci byla dokázána ve studii Qu a kol. (2012). Rozdělení na hydrofilní/hydrofobní frakci také závisí na podmínkách frakcionace, zejména pH, které ovlivňuje strukturu látek (Šafaříková a kol., 2013). Obecně platí, že HPI část je složena ze sacharidů/polysacharidů, peptidů, hydroxy kyselin, nízkomolekulární karboxylových kyselin, aldehydů, ketonů a aminokyselin, přičemž HPO frakce obsahuje uhlovodíky, vysokomolekulární alkyl aminy, vysokomolekulární karboxykyseliny (mastné kyseliny), aromatické kyseliny a fenoly (Edzwald, 1993).

4.4. Hodnoty SUVA

Hodnoty SUVA EOM a COM jsou znázorněny v tabulce 2. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny během růstu organismů v extracelulární složce. Ve stacionární fázi pak SUVA dosahovala přibližně polovičních hodnot. Stejně pak i hodnoty SUVA pro COM byly téměř 2x nižší oproti hodnotám stacionární fázi. Pouze hodnoty SUVA sinice *Merismopedia tenuissima* jsou v porovnání s hodnotami SUVA naměřenými u ostatních organismů nízké a rozdíl mezi jednotlivými fázemi je minimální. Nejvyšších hodnot SUVA v exponenciální fázi bylo dosaženo u EOM rozsivky *Fragilaria crotonensis*, a to $1,80 \pm 0,40$ L/(m.mg). Následovala sinice *Microcystis aeruginosa*, pro kterou byla naměřena hodnota $1,60 \pm 0,40$ L/(m.mg), dále zelená řasa *Chlamydomonas geitleri* s hodnotou SUVA $1,20 \pm 0,30$ L/(m.mg) a sinice *M. tenuissima* s hodnotou SUVA pouze $0,20 \pm 0,10$ L/(m.mg). Ve stacionární fázi zůstalo pořadí hodnot pro jednotlivé druhy nezměněno. Hodnota pro *Fragilaria crotonensis* činila $0,80 \pm 0,30$ L/(m.mg), pro *M. aeruginosa* $0,70 \pm 0,30$ L/(m.mg), pro řasu *Chl. geitleri* $0,60 \pm 0,20$ L/(m.mg) a pro *M. tenuissima* $0,30 \pm 0,05$ L/(m.mg). V COM složce jsou hodnoty SUVA pro vybrané mikroorganismy téměř srovnatelné, a to konkrétně pro *F. crotonensis* $0,40 \pm 0,10$ L/(m.mg), pro *M. aeruginosa* $0,40 \pm 0,02$ L/(m.mg), pro *M. tenuissima* $0,35 \pm 0,10$ L/(m.mg) a nejnižší hodnota byla naměřena u *Chl. geitleri*, $0,30 \pm 0,10$ L/(m.mg).

Pro srovnání jsou v tabulce 3 uvedeny hodnoty dalších autorů, kteří se zabývali podobnými nebo stejnými druhy sinic, zelených řas a rozsivek. Je patrné, že hodnoty SUVA se se stářím kultury mění a zpravidla klesá v pořadí exponenciální fáze EOM > stacionární fáze EOM > COM, což je v souladu se studiemi Fang a kol. (2010) a Henderson a kol. (2008). Fang a kol. (2011) naměřili nižší hodnoty SUVA pro IOM ($0,58$ L/(m.mg)) než EOM ($1,38$ L/(m.mg)) *M. aeruginosa*. Henderson a kol. (2008) uvádí hodnoty SUVA EOM sinice *M. aeruginosa* v exponenciální fázi $1,65$ L/(m.mg) a ve stacionární fázi $0,48$ L/(m.mg).

Tabulka 2: Hodnoty SUVA pro EOM v exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) fázi a pro COM frakci

Mikroorganismus	Růstová fáze	Naměřené hodnoty
<i>Microcystis aeruginosa</i>	EXP	1,60 ± 0,40
	STAT	0,70 ± 0,30
	COM	0,40 ± 0,20
<i>Merismopedia tenuissima</i>	EXP	0,20 ± 0,10
	STAT	0,30 ± 0,05
	COM	0,35 ± 0,10
<i>Fragilaria crotonensis</i>	EXP	1,80 ± 0,40
	STAT	0,80 ± 0,30
	COM	0,40 ± 0,10
<i>Chlamydomonas geitleri</i>	EXP	1,20 ± 0,30
	STAT	0,60 ± 0,20
	COM	0,30 ± 0,10

SUVA (L/(m.mg))

Tabulka 3: Hodnoty SUVA pro EOM v exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) fázi a pro COM frakci z jiných studií

Mikroorganismus	Růstová fáze	Nguyen a kol. 2005	Henderson a kol. 2008	Fang a kol. 2010	Yang a kol. 2011
<i>Microcystis aeruginosa</i>	EXP	-	1,65	1,38	0,60
	STAT	-	0,48	-	0,50
	COM	-	-	0,58	1,00
<i>Asterionella formosa</i>	EXP	-	1,70	-	-
	STAT	-	0,54	-	-
<i>Melosira sp.</i>	EXP	-	0,58	-	-
<i>Oscillatoria prolifera</i>	EXP	0,80 ± 0,10	-	-	-
<i>Chaetoceros mulleri</i>	EXP	1,00 ± 0,40	-	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	EXP	-	1,29	-	1,00
	STAT	-	0,54	-	1,30
	COM	-	-	-	1,50
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	EXP	1,50 ± 0,50	-	-	-

SUVA (L/(m.mg))

Pro EOM rozsivky *Asterionella formosa* dosahuje SUVA hodnoty 1,79 L/(m.mg) v exponenciální fázi a 0,54 L/(m.mg) ve stacionární fázi. Druhá rozsivka, *Melosira sp.*, má ve stacionární fázi hodnotu SUVA 0,58 L/(m.mg). Hodnoty SUVA EOM pro zelenou řasu *Chlorella vulgaris* jsou v exponenciální fázi 1,29 L/(m.mg) a ve stacionární fázi 0,54 L/(m.mg). Práce Yang a kol. (2011) se zabývala studií řasy

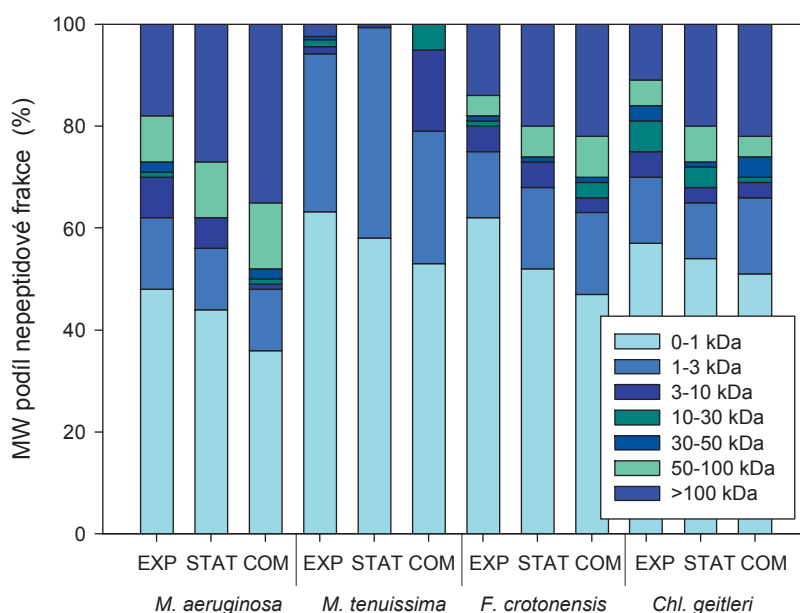
Chl. vulgaris a sinice *M. aeruginosa*. Výsledky pro *Chl. vulgaris* ukazují naopak na narůstání hodnot SUVA se stářím kultury. Hodnota SUVA EOM zelené řasy dosahovala 7. den kultivace 1,00 L/(m.mg) a 22. den kultivace 1,30 L/(m.mg), pro COM složku byla zjištěna hodnota 1,20 L/(m.mg). Pro EOM sinice *M. aeruginosa* byly hodnoty SUVA 7. den kultivace 0,60 L/(m.mg) a ve stacionární fázi (22. den) 0,50 L/(m.mg). Hodnota SUVA pro celulární složku sinice je 1,00 L/(m.mg). Studie Nguyen a kol. (2005) měřila hodnoty SUVA u sinice *Oscillatoria prolifera*, zelené řasy *Scenedesmus quadriacauda* a rozsivky *Chaetoceros mulleri* pouze v exponenciální fázi a konkrétní hodnoty jsou $0,80 \pm 0,10$ L/(m.mg) pro sinici, $1,50 \pm 0,50$ L/(m.mg) pro řasu a $1,00 \pm 0,40$ L/(m.mg) pro rozsivku. Z výsledků těchto studií vyplývá, že SUVA má většinou tendenci klesat s rostoucím obsahem intracelulárních organických látek, jejichž koncentrace stoupá po celou dobu kultivace vzhledem k rostoucí míře lyze buněk.

4.5. Molekulové hmotnosti

U vzorků EOM i COM byla provedena frakcionace látek na základě rozdílných molekulových hmotností.

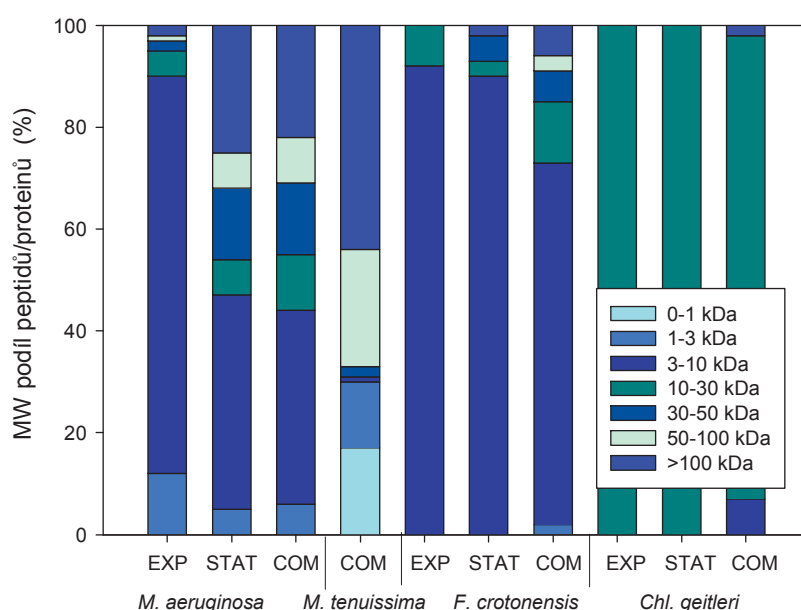
Výsledky frakcionace nepeptidové složky je znázorněna na obr. 5. Největší podíl představuje frakce 0–1 kDa. Druhou nejvíce zastoupenou frakcí jsou naopak vysokomolekulární sloučeniny o MW > 100 kDa. U sinice *Microcystis aeruginosa* tvoří neproteinovou složku v exponenciální fázi růstu zejména látky o MW < 1 kDa, a to ze 48 %, dále také látky o MW > 100 kDa (18 %) a látky v rozmezí 1-3 kDa (14 %). Ve stacionární fázi a u COM je toto dominantní zastoupení téměř stejné, mění se však jeho poměry. Konkrétně ve stacionární fázi je zastoupení nízkomolekulárních látek 44 %, vysokomolekulárních látek 27 % a sloučenin v rozmezí 1-3 kDa 12 %. V COM je podíl nízko- a vysokomolekulárních látek téměř vyrovnaný, látky o MW < 1 kDa tvoří 36 % a látky o MW > 100 kDa 35 %. Sinice *Merismopedia tenuissima* je v exponenciální fázi tvořena převážně sloučeninami o MW < 1 kDa (63 %) a 1-3 kDa (32 %). Ve stacionární fázi tyto frakce opět dominují. Látky o MW < 1 kDa zaujímají 58 % a látky o MW 1-3 kDa 41 %. V COM je vedle dvou stávajících dominantních frakcí (53 % pro látky o MW < 1 kDa a 26 % pro složku 1-3 kDa) významně zastoupena také frakce o MW 3-10 kDa (16 %). Neproteinová složka rozsivky *F. crotonensis* se skládá ve všech růstových fázích převážně z nízko- a vysokomolekulárních sloučenin. V exponenciální fázi zaujímají nízkomolekulární látky 62 % nepeptidové složky a vysokomolekulární látky 14 %. Vedle nich

se tu nachází frakce 1-3 kDa se zastoupením 3 %. Ve stacionární fázi dochází k úbytku nízkomolekulárních látek na 52 % a naopak nárůstu vysokomolekulární frakce na 20 % a frakce 1-3 kDa na 16 %. COM rozsivky pak mají obdobné složení jako ve stacionární fázi, a to 47 % pro sloučeniny o MW < 1 kDa, 22 % pro sloučeniny o MW > 100 kDa a 16 % pro látky o MW 1-3 kDa. Zelená řasa *Chl. geitleri* má téměř stejné zastoupení nízkomolekulárních látek ve všech třech zjišťovaných fázích růstu. V exponenciální fázi tvoří nízkomolekulární látky 57 % nepeptidové složky. Vedle toho je významná také frakce 1-3 kDa, která zaujímá 13 % a vysokomolekulární látky zaujímající 11 %. Ve stacionární fázi se mění poměr dominantních frakcí, a to 54 % pro látky o MW < 1 kDa, 20 % pro vysokomolekulární látky a 11 % pro látky o MW 1-3 kDa. COM složka zelené řasy se sestává z 51 % z nízkomolekulárních látek, z 22 % z látek o MW > 100 kDa a z 15 % z látek o MW 1-3 kDa. Tyto výsledky korespondují s výsledky studií Henderson a kol. (2008) a Qu a kol. (2012). V práci Henderson a kol. (2008) byla zjištěna distribuce nízko- a vysokomolekulárních látek u EOM sinice *M. aeruginosa*, zelené řasy *Chlorella vulgaris* a rozsivky *Asterionella formosa* a *Melosira* sp. Qu a kol. (2012) uvádí, že neproteinové látky sinice *M. aeruginosa* o MW > 100 kDa tvoří přibližně 30 % a látky o MW < 1 kDa 50 %.



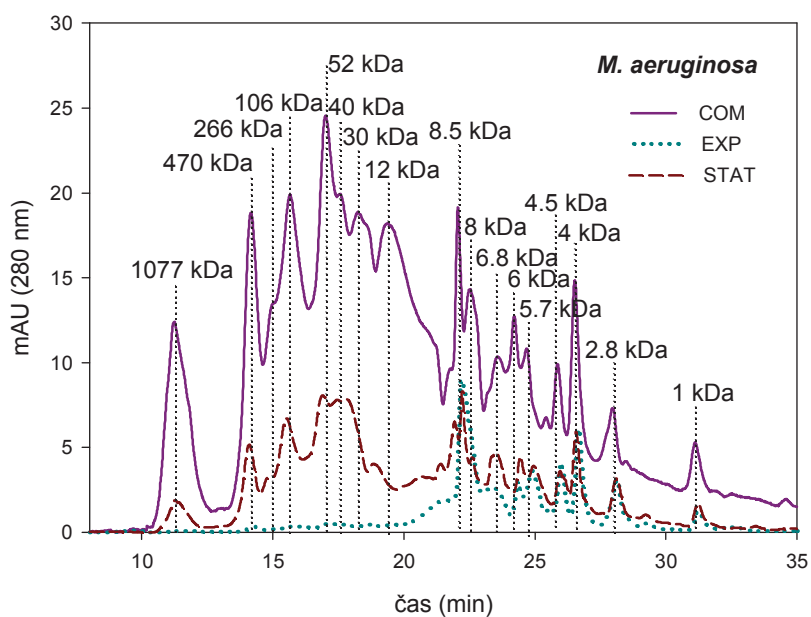
Obr. 5 Molekulové hmotnosti nepeptidové složky měřené v exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) fázi a v COM

Frakcionace peptidů a proteinů dle MW u studovaných organismů je znázorněna na obr. 6. U *M. aeruginosa*, *F. crotonensis* a *Chl. geitleri* je patrný rozdílný vývoj produkce peptidových/proteinových organických látek. Ve všech růstových fázích u *M. aeruginosa* má největší zastoupení frakce 3-10 kDa (78 % u EOM v exponenciální fázi, 42 % ve stacionární fázi a 38 % v COM složce). Vedle této frakce jsou ve stacionární fázi a v COM složce významné vysokomolekulární látky s MW > 100 kDa (25 % pro stacionární fázi a 22 % pro COM složku). U sinice *M. tenuissima* je COM složka tvořena zejména vysokomolekulární frakcí > 100 kDa (44 %), látkami MW 50-100 kDa (23 %) a látkami o MW < 3 kDa (MW < 1 kDa 17 % a MW 1-3 kDa 13 %). Z důvodu nízké koncentrace peptidů/proteinů nemohly být u sinice *M. tenuissima*, s ohledem na danou metodiku, naměřeny hodnoty molekulových frakcí v exponenciální a stacionární fázi. U *F. crotonensis* převažuje frakce látek o MW v rozmezí 10-30 kDa (92 % v exponenciální fázi, 90 % ve stacionární fázi a 71 % u COM složky). U *Chl. geitleri* je v exponenciální a stacionární fázích dominantní frakce 10-30 kDa, která v obou růstových fázích zaujímá 100 %. U COM tato frakce tvoří 91 %, látky o MW 3-10 kDa 7 % a látky o MW > 100 kDa 2 %. Studie Qu a kol. (2012) zaznamenala v peptidové složce zejména látky o MW > 100 kDa a MW < 1 kDa (36 % a 35 %). U žádného studovaného organismu ve složce peptidů/proteinů nebyla v exponenciální a stacionární fázi zaznamenána frakce o MW < 1 kDa. Naproti tomu ve studii Henderson a kol. (2008) tato frakce zjištěna byla. Tyto nízkomolekulární látky se nacházejí u mladých kultur a řadí se sem především aminokyseliny (Huang a kol., 2007). Látky o MW 1-3 kDa tvoří oligopeptidy, např. ze sinicových toxinů a siderofory, které představují látky schopné vázat železo potřebné pro růst organismu (Harada, 2004). Organické látky < 50 kDa obsahují zejména proteiny, extracelulární enzymy a jejich komponenty (Chróst a kol., 1989). Druhou největší frakcí zastoupenou v peptidové části byly sloučeniny s MW > 100 kDa. Tuto část představují především zásobní proteiny u sinic a enzymy u ostatních (Lee, 2008).

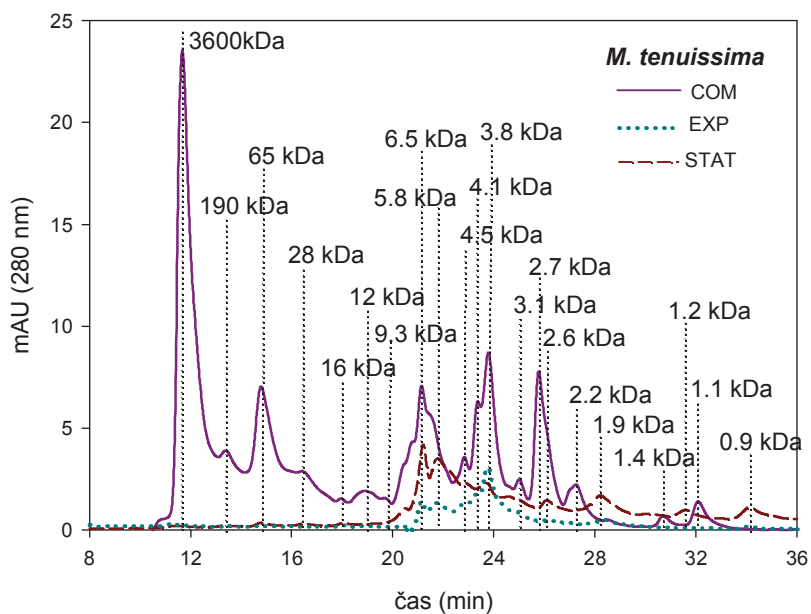


Obr. 6 Molekulové hmotnosti peptidové/proteinové složky měřené v exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) fázi a v COM

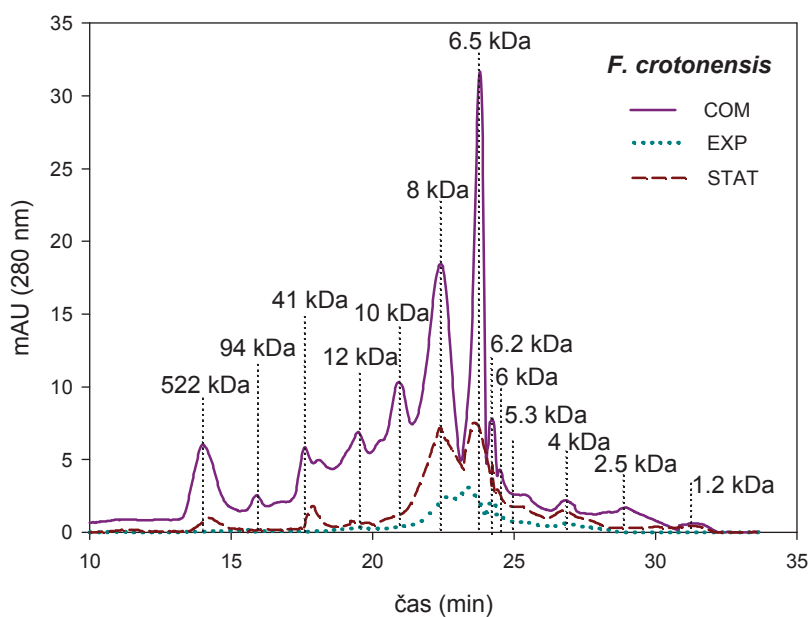
MW distribuci peptidů/proteinů ve složce EOM v exponenciální a stacionární fázi a také u složky COM determinované pomocí HPSEC znázorňují obr.7a-d. Z chromatogramů je patrné, že diverzita a množství peptidů/proteinů se se stářím kultury u všech studovaných organismů zvyšuje. Sinice *M. aeruginosa* produkuje ze všech organismů nejrozmanitější skupinu sloučenin, zejména vysokomolekulárních látek (> 100 kDa), což je v souladu s výsledky MW frakcionace za pomoci odstředivých filtrů Amicon Ultra-15 (Millipore, USA). V exponenciální fázi růstu bylo detekováno široké spektrum nízkomolekulárních látek. Ve stacionární fázi již byly zjištěny také vysokomolekulární látky a jejich diverzita výrazně narostla v COM složce (106 kDa, 266 kDa, 470 kDa, 1077 kDa). Sinice *M. tenuissima* produkuje stejně jako předešlá sinice velké množství AOM o různých MW, avšak zejména o látky s MW < 30 kDa. U sinice byla detekovaná látka o nejvyšší zjištěné MW, a to 3600 kDa. U rozsivky *F. crotonensis* byly stanoveny v EOM složce zejména proteiny s MW > 40 kDa a v COM složce byla již detekována také vysokomolekulární látka o MW 522 kDa. Zelená řasa *Chl. geitleri* se vyznačuje produkcí zejména látek o molekulové hmotnosti > 30 kDa a v COM složce byla zjištěna látka s nejvyšší MW 204 kDa.



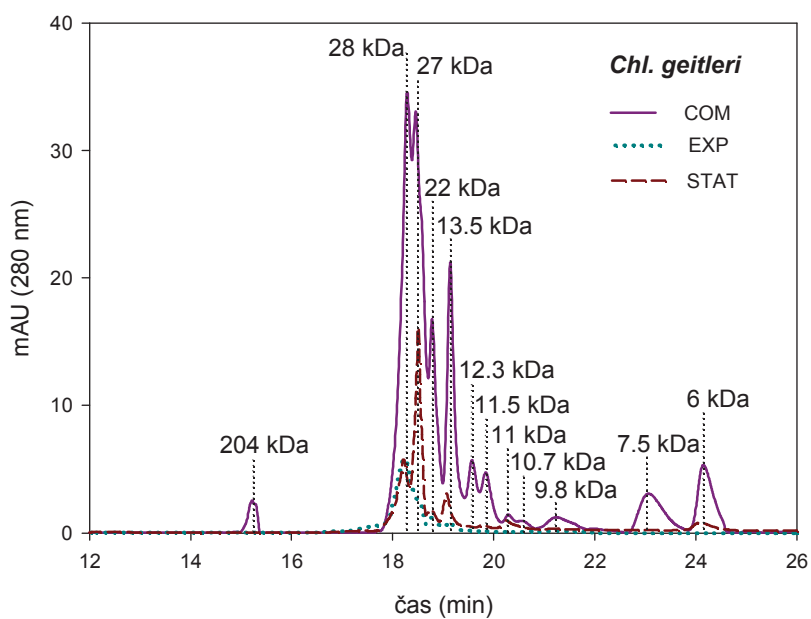
Obr. 7a Molekulové hmotnosti peptidové/proteinové složky stanové v exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) fázi a v COM pomocí HPSEC pro *M. aeruginosa*



Obr. 7b Molekulové hmotnosti peptidové/proteinové složky stanové v exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) fázi a v COM pomocí HPSEC pro *M. tenuissima*



Obr. 7c Molekulové hmotnosti peptidové/proteinové složky stanové v exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) fázi a v COM pomocí HPSEC pro *F. crotonensis*



Obr. 7d Molekulové hmotnosti peptidové/proteinové složky stanové v exponenciální (EXP) a stacionární (STAT) fázi a v COM pomocí HPSEC pro *Chl. geitleri*

Ve studii Pivokonský a kol. (2006) jsou uvedeny obdobné trendy v růstu množství a různorodosti peptidů/proteinů u sinic *M. aeruginosa*, *Anabaena flos-aqua* a řasy *Scenedesmus quadricauda*. Avšak *A. flos-aqua* a *S. quadricauda* vykazovaly nižší diverzitu sloučenin podobnou spíše zde studované zelené řase *Chl. geitleri*. Zjištěné výsledky dále korespondují s pracemi Fang a kol. (2010) a Li a kol. (2012), které také zjistili více vysokomolekulárních peptidů/proteinů v COM složce oproti EOM složce.

Nárůst množství vysokomolekulárních látek během růstu organismů má bezpochyby vliv na procesy úpravy vody. Vysokomolekulární látky se snáze odstraňují konvenční úpravou, zatímco pro nízkomolekulární sloučeniny není koagulace příliš účinná, jak blíže popisují práce Pivokonský a kol. (2012) a Šafaříková a kol. (2013). V takovém případě je třeba vedle koagulace zařadit do procesu úpravy vody např. membránové filtrace, případně adsorpci na aktivním uhlí. Adsorpci se blíže zabývala studie Kopecká a kol. (2014), která se zabývala za použití dvou druhů aktivního uhlí odstraněním peptidové/proteinové části COM sinice *M. aeruginosa*. Látky s vysokou molekulovou hmotností byly odstraňovány velmi obtížně, zatímco látky s nízkou molekulovou hmotností byly při adsorpci preferovány. To je zřejmě způsobeno lepší dostupností mikropórů uhlí pro tyto látky (Hnaťuková a kol., 2011; Kopecká a kol., 2014).

5. Závěr

Organické látky produkované studovaným fytoplanktonem ukazují několik podobností, zejména významné podíly v produkci peptidů/proteinů, nízké hodnoty SUVA a vysoký obsah hydrofilních látek. Složení a vlastnosti AOM se měnily v průběhu růstu organismů a byly prokázány významné rozdíly mezi EOM a COM. Se stářím kultury vzrůstala zejména diverzita a množství peptidů/proteinů, podíl hydrofilní frakce a vysokomolekulárních organických látek. Výrazně vyšší diverzita organických látek byla zaznamenána u COM ve srovnání s EOM.

Celkový rozpuštěný organický uhlík (DOC_T) rostl téměř lineárně v exponenciální a stacionární fázi růstu u všech organismů. Sinice *M. aeruginosa* a *M. tenuissima* produkovaly nejvíce organických látek (71 mg/L a 73 mg/L), naproti tomu produkce organických látek rosnivky *F. crotonensis* a řasy *Chl. geitleri* byla nižší (48 mg/L a 21 mg/L). Podíl peptidové/proteinové složky se během růstu organismů zvyšoval a ve 20. dnu kultivace činil u *M. aeruginosa* 47 % z celkového DOC, u *M. tenuissima* 20 %, u *F. crotonensis* 42 % a *Chl. geitleri* 28 %. Celulární složka všech studovaných organismů obsahovala nejvyšší zastoupení peptidové složky, a to u *M. aeruginosa* 63 % z DOC, u *M. tenuissima* 44 %, u *F. crotonensis* 53 % a u *Chl. geitleri* 33 %. EOM a COM složka byla charakterizovaná také pomocí charakteristiky SUVA, kdy všechny organismy vykazovaly nízké hodnoty, tj. $< 2 \text{ L}/(\text{m}.\text{mg})$, z čehož vyplývá nízký obsah aromatických látek. Zpravidla nejvyšší hodnoty byly naměřeny v exponenciální fázi, pouze u *M. tenuissima* byly rozdíly mezi jednotlivými růstovými fázemi zanedbatelné ($0,2 \text{ L}/(\text{m}.\text{mg})$ v exponenciální fázi a $0,3 \text{ L}/(\text{m}.\text{mg})$ ve stacionární fázi). Frakcionace dle afinity k vodě EOM a COM prokázala u všech organismů vysoký obsah hydrofilní složky (sacharidy, peptidy, karboxykyseliny aj.), konkrétně 69-74 % u EOM a přibližně 90 % u COM. V rámci molekulových hmotností vykazovaly mikroorganismy zastoupení širokého spektra látek. Tento trend byl nejpatrnější u *M. aeruginosa*, kdy se zvyšovala diverzita a složení sloučenin se stářím kultury. Studované organismy obsahovaly odlišné zastoupení molekulových hmotností u peptidové/proteinové a nepeptidové složky. U peptidové/proteinové EOM i COM *M. aeruginosa* převažovala frakce o MW 3-10 kDa (37-78 %), u STAT a COM pak měla významné zastoupení i frakce o MW > 100 kDa (22-25 %). Peptidové/proteinové EOM i COM složce *F. crotonensis* dominovala

frakce o MW 3-10 kDa (71-92 %). U EOM i COM *Chl. geitleri* zcela převládala frakce o MW 10-30 kDa (91-100 %). Proteinové COM *M. tenuissima* obsahovaly 44 % vysokomolekulárních látek > 100 kDa a 23 % látek s MW 50-100 kDa. Nepeptidová složka EOM a COM všech organismů vykazovala vyšší diverzitu zastoupených molekulových hmotností. U EOM i COM se nacházely látky nepeptidového charakteru především o MW 0-1 kDa (36-63 %), 1-3 kDa (12-41 %) a > 100 kDa (11-35 %).

Prokázali jsme, že produkce AOM závisí na druhu organismu a že sinice produkují prokazatelně vyšší množství organických látek oproti rozsívce a zelené řase. Stejně tak podíl peptidů/proteinů byl u sinice *M. aeruginosa* vyšší oproti *F. crotonensis* a *Chl. geitleri*. Nicméně druhá sinice *M. tenuissima* měla tento podíl nižší oproti *F. crotonensis*. Dále jsme zjistili, že COM všech organismů má vyšší diverzitu zastoupených molekulových hmotností a obsahují vyšší podíly hydrofilních látek, zejména peptidů/proteinů.

Zjištěné složení a charakter AOM vybraných druhů mikroorganismů je prvním nezbytným krokem pro popis a pochopení procesů spojených s úpravou surové vody z eutrofizovaných zdrojů. V následných studiích tak umožní především popis interakcí mezi jednotlivými složkami AOM na jedné straně a koagulačními činidly, povrchem aktivního uhlí či membrán filtrů na straně druhé. Na základě zjištěných vlastností AOM můžeme již nyní predikovat malou účinnost odstranitelnosti nízkomolekulární hydrofilní složky koagulací a nezbytnost zavést další stupeň úpravy, např. adsorpci či membránovou filtraci.

6. Použitá literatura

- Babica, P., Maršálek, B., Bláha, L., Drábková, M. (2004): Toxiny sinic – zbraň proti konkurenci?. *Živa* 4/2004, 150-152.
- Bernhardt, H., Hoyer, O., Shell, H., Lüsse, B. (1985): Reaction mechanisms involved in the influence of algogenic organic matter on flocculation. *Journal for Water and Wastewater Research (Zeitschrift für Wasser und Abwasser Forschung)* 18 (1), 18-30.
- Bláha, L., Maršálek, B. (2003): Contamination of drinking water in the Czech Republic by microcystins. *Archiv für Hydrobiologie* 158 (3), 421-429.
- Bláha, L., Babica, P., Maršálek, B. (2009): Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology* 2 (2), 36-41.
- Blomqvist, P. (2001): Phytoplankton responses to biomanipulated grazing pressure and nutrient additions - enclosure studies in unlimed and limed Lake Njupfatet, central Sweden. *Environmental Pollution* 111, 333-348.
- Campinas, M., Rosa, M. J. (2010): Evaluation of cyanobacterial cells removal and lysis by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 70 (3), 345-353.
- Clark, R. F., Williams, S. R., Nordt, S. P., Manoguerra, A. S. (1999): A review of selected seafood poisonings. *Fall* 26 (3), 84-175.
- Cook, D. and Newcombe, G. (2002) Removal of microcystin variants with powdered activated carbon. *Water Science & Technology: Water Supply* 2(5/6), 201- 207.
- Coral, L. A., Zamyadi, A., Barbeau, B., Bassetti, F. A., Lapolli, F. A., Prévost, M. (2013): Oxidation of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* by ozone: Impacts on cell integrity and chlorination by-product formativ. *Water Research* 47 (9), 2983-2994.

- Creighton, T.E., (1993): *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed. W.H. Freeman and Company, New York, s. 507.
- Dixon, M. B., Falconet, C., Ho, L., Chow, C. W. K., O'Neill B. K., Newcombe, G. (2010): Nanofiltration for the removal of algal metabolites and the effects of fouling. *Water Science* 61 (5), 1189-1199.
- Egge, J. K., Aksnes, D. L. (1992): Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition. *Marine Ecology Progress Series* 83, 281-289.
- Edzwald, J. K. (1993): Coagulation in drinkink water treatment: Particles, organics and coagulants. *Water Science and Technology* 27 (11), 21-35.
- Falciatore, A. (2005): The FLP proteins act as regulators of chlorophyll synthesis in response to light and plastid signals in *Chlamydomonas*. *Genes* 19 (1), 176-187.
- Fang, J., Yang, X., Ma, J., Shang, C., Zhao, Q. (2010): Characterization of algal organic matter and formation of DBPs from chlor(am)ination. *Water Research* 44 (20), 5897-5906.
- Fogg, G. E. (1971): Extracellular products of algae in freshwater. *Archiv für Hydrobiologie – Beiheft Ergebnisse der Limnologie* 5, 1-25.
- Fogg, G. E. (1983): The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Botanica Marina* 26 (1), 3-14.
- Furnas, M. J. (1990): In situ growth rates of marine phytoplankton: approaches to measurement, community and species growth rates. *Journal of Plankton Research* 12 (6), 1117-1151.
- Guilherme, S., Rodriguez, M. J. (2014): Occurrence of regulated and non-regulated disinfection by-products in small drinking water systems. *Chemosphere* 117, 425-432.
- Harada, K. I. (2004): Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 52 (8), 889-899.

- Hellebust, J.A. (1974): Extracellular products. In: *Algal physiology and biochemistry* (Stewart, W.D.P., Ed.), University of California Press, Berkeley, 989 s.
- Henderson, R. K., Baker, A., Parsons, S. A., Jefferson, B. (2008): Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Research* 42 (13), 3435-3445.
- Henderson, R. K., Parsons, S. A., Jefferson, B. (2010): The impact of differing cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae. *Water Research* 44 (12), 3617-3624.
- Her, N., Amy, G., Park, H. R., Song, M. (2004): Characterizing algogenic organic matter (AOM) and evaluating associated NF membrane fouling. *Water Research* 38 (6), 1427-1438.
- Hitzfeld, B. C., Höger, S. J., Dietrich, D. R. (2000): Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 108 (1), 113-122.
- Hnat'uková, P., Kopecká, I., Pivokonský, M. (2011): Adsorption of cellular peptides of *Microcystis aeruginosa* and two herbicides onto activated carbon: Effect of surface charge and interactions. *Water Research* 45 (11), 3359-3368.
- Ho, L., Onstad, G., Gunten, U., Rinck-Pfeiffer, S., Craig, K., Newcombe, G. (2006). Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. *Water Research* 40 (6), 1200-1209.
- Ho, L., Slyman, N., Kaeding, U., Newcombe, G. (2008): Optimizing PAC and chlorination practices for cylindrospermopsin removal. *Journal of American Water Works Association* 100, 88-96.
- Ho, L., Lambling, P., Bustamante, H., Duker, P., Newcombe, G. (2011): Application of powdered activated carbon for the adsorption of cylindrospermopsin and microcystin toxins from drinking water supplies. *Water Research* 45 (9), 2954-2964.

- Hong, H. C., Mazumder, A., Wong, M. H., Liang, Y. (2008): Yield of trihalomethanes and haloacetic acids upon chlorinating algal cells, and its prediction via algal cellular biochemical composition. *Water Research* 42 (20), 4941-4948.
- Hong, H. C., Wong, M. H., Liang, Y. (2009): Amino acids as precursors of trihalomethane and haloacetic acid formation during chlorination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56 (4), 638-645.
- Hoyer, O., Lüsse, B., Bernhardt, H. (1985): Isolation and characterization of extracellular organic matter (EOM) from algae. *Zeitschrift für Wasser und Abwasserforschung* 18 (2), 76-90.
- Hua, G., Reckhow D. A., Abusallout, I. (2015): Correlation between SUVA and DBP formation during chlorination and chloramination of NOM fractions from different sources. *Chemosphere* 130, 82-89.
- Huang, H., Lee, N., Young, T., Gary, A., Lozier, J., Jacangelo, J. (2007): Natural organic matter fouling of low-pressure, hollow-fiber membranes: Effects of NOM source and hydrodynamic conditions. *Water Research* 41 (17), 3823-3832.
- Huang, J., Graham, N., Templeton, M. R., Zhang, Y., Collins, C., Nieuwenhuijsen, M. (2009): A comparison of the role of two blue-green algae in THM and HAA formation. *Water Research* 43 (12), 3009-3018.
- Huang, W., Chu, H., Dong, B. (2012): Characteristics of algogenic organic matter generated under different nutrient conditions and subsequent impact on microfiltration membrane fouling. *Desalination* 293, 104-111.
- Chiou, Y. T., Hsieh, M. L., Yeh, H. H. (2010): Effect of algal extracellular polymer substances on UF membrane fouling. *Desalination* 250 (2), 648-652.
- Chon, K., Cho, J., Shon, H. K. (2013): Advanced characterization of algogenic organic matter, bacterial organic matter, humic acids and fulvic acids. *Water Science* 67 (10), 2228-2235.

- Chróst, R. J., Münster, U., Rai, H., Albrecht, D., Witzel, P. K., Overbeck, J. (1989): Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the euphotic zone of a eutrophic lake. *J. Plankt. Res.* 11 (2), 223-242.
- Internet 1: *Algae: information about algae and algal toxins* (www.algae.info). Ruth Consolidated Industries Pty Ltd., Rural Chemical Industries Pty Ltd., Austrálie [cit. 2015-08-10].
- Jančula, D., Straková, L., Sadílek, J., Maršálek, B., Babica, P. (2014): Survey of cyanobacterial toxins in Czech water reservoirs – the first observation of neurotoxic saxitoxins. *Environmental Science and Pollution Research* 21 (13), 8006-8015.
- Jurczak, T., Tarczynska, M., Izydorczyk, K., Mankiewicz, J., Zalewski, M., Meriluoto, J. (2005): Elimination of microcystins by water treatment processes – examples from Sulejow Reservoir, Poland. *Water Research* 39 (11), 2394-2406.
- Kim, J., Kang, B. (2007): DBPs removal in GAC filter-adsorber. *Water Research* 42 (1-2), 145–152.
- Komárek, J. (2006): The modern clasiffication of cyanoprokaryotes (cyanobacteria). *Oceanological and Hydrobiological Studies* 34 (3), 5-17.
- Kopecká, I., Pivokonský, M., Pivokonská, L., Hnaťuková, P., Šafaříková, J. (2014): Adsorption of peptides produced by cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* onto granular activated carbon. *Carbon* 69, 595-608.
- Koza, V., Rederer, L. (2013): Vodárenské nádrže Jizerských hor, kvalita vody a její změny. *Vodohospodářská konference Vodní nádrže 2013*, 104-108.
- Lee, N. H., Amy, G., Croué, J. P. (2006): Low-pressure membrane (MF/UF) fouling associated with allochthonous versus autochthonous natural organic matter. *Water Research* 40(12), 2357-2368.
- Lee, R. E. (2008): Phycology. 4rd ed. *Cambridge: Cambridge University Press.* Cambridge UK, s. 547.

- Leenheer, J. A., Croué, J. P. (2003): Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 37 (1), 18-26.
- Leloup, M., Nicolau, R., Pallier, V., Yéprémian, C., Feuillade-Cathalifaud, G. (2013): Organic matter produced by algae and cyanobacteria: Quantitative and qualitative characterization. *Journal of Environmental Sciences* 25 (6), 1089-1097.
- Li, L., Gao, N., Deng, Y., Yao, J., Zhang, K. (2012): Characterization of intracellular & extracellular algae organic matters (AOM) of *Microcystis aeruginosa* and formation of AOM-associated disinfection byproducts and odor & taste compounds. *Water Research* 46 (4), 1233-1240.
- Li, Q., Jonas, U., Zhao, X. S., Kappl, M. (2008): The forces at work in colloidal self-assembly: a review on fundamental interactions between colloidal particles. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 3 (3), 255-268.
- Liang, Y., Hilal, N., Langston, P., Starov, V. (2007): Interaction forces between colloidal particles in liquid: Theory and experiment. *Advances in Colloid and Interface Science* 134-135 (3), 151-166.
- Ma, M., Liu, R., Liu, H., Qu, J. (2012): Effect of moderate pre-oxidation on the removal of *Microcystis aeruginosa* by KMnO_4 -Fe(II) process: Significance of the in-situ formed Fe(III). *Water Research* 46 (1), 73-81.
- Maksimova, I. V., Bratkovskaya, L. B., Plekhanov, S. E. (2004): Extracellular carbohydrates and polysaccharides of the alga *Chlorella pyrenoidosa* chick S-39. *Biology Bulletin* 31 (2), 175-181.
- Matilainen, A., Gjessing E. T., Lahtinen T., Hed L., Bhatnagar A., Sillanpää M. (2011): An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere* 83, 1431-1442.
- Meriuloto, J. A. O., Spoof, L. E. M. (2008): Cyanotoxins: sampling, sample processing and toxin uptake (Hudnell, H.), *New York: Springer*, 400 s.

- Mohamed, Z. A., El-Sharouny H. M., Ali, W. S. M. (2006): Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. *Toxicon* 47 (5), 584-590.
- Newcombe, G. (2006): Removal of natural organic material and algal metabolites using activated carbon. In: Newcombe, G., Dixon, D., editors. Interface science in drinking water treatment: Theory and application 10, *Elsevier Ltd.*, 133-153.
- Nguyen, M. L., Westerhoff, P., Baker, L., Hu, Q., Esparza-Soto, M., Sommerfeld, M. (2005): Characteristics and reactivity of algae-produced dissolved organic carbon. *Journal of Environmental Engineering – ASCE* 131 (11), 1574-1582.
- Ongley, S. E., Bian, X., Zhang, Y., Chau, R., Gerwick, W. H., Müller, R., Neilan, B. A. (2013): High-titer heterologous production in *E. coli* of lyngbyatoxin, a protein kinase C activator from an uncultured marine cyanobacterium. *ACS Chemical Biology* 8 (9), 1888-1893.
- Palmer, C. J., Reason, Ch. J. (2009): Relationships of surface bromoform concentrations with mixed layer depth and salinity in the tropical oceans. *Global Biogeochemical Cycles* 23 (2), 1-10.
- Penru Y., Simon, F. X., Guastalli, A. R., Esplugas, S., Llorens, J., Baig, S. (2013). Characterization of natural organic matter from Mediterranean coastal seawater. *Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua* 62 (1), 42-46.
- Pereira, P., Onoderab, H., Andrinoloc, D. A., Francaa, S., Araújo, F., Lagosc, N., Oshimab, Y. (2000): Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon Flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38, 1689-1702.
- Pivokonský, M., Klouček, O., Pivokonská, L. (2006): Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Research* 40 (16), 3045-3052.

- Pivokonský, M., Polášek, P., Pivokonská, L., Tomášková, H. (2009): Optimized reaction conditions for removal of cellular organic matter of *Microcystis aeruginosa* during the destabilization and aggregation process using ferric sulphate in water purification. *Water Environment Research* 81 (5), 514-522.
- Pivokonský, M., Šafaříková, J., Bubáková, P., Pivokonská, L. (2012): Coagulation of peptides and proteins produced by *Microcystis aeruginosa*: Interaction mechanisms and the effect of Fe-peptide/protein complexes formation. *Water Research* 46 (17), 5583-5590.
- Pivokonský, M., Šafaříková, J., Barešová, M., Pivokonská, L., Kopecká, I. (2014): A comparison of the character of algal extracellular versus cellular organic matter produced by cyanobacterium, diatom and green alga. *Water Research* 51, 37-46.
- Pivokonský, M., Načeradská, J., Brabenec, T., Novotná, K., Barešová, M., Janda, V. (2015): The impact of interactions between algal organic matter and humic substances on coagulation. *Water Research* 84, 278-285.
- Plummer, J. D., Edzwald, J. K. (2002): Effects of chlorine and ozone on algal cell properties and removal of algae by coagulation. *Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua* 51 (6), 307-318.
- Quiblier, C., Wood, S., Echenique-Subiabre, I., Heath, M., Villeneuve, A., a Humbert J. F. (2013): A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – Ecology, toxin production and risk management. *Water Research* 47 (15), 5464-5479.
- Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R., De Marini, D. M. (2007): Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research* 636 (1-3), 178-242.
- Richardson, S. D. (2011): Disinfection By-Products: Formation and occurrence in drinking water. *Encyclopedia of Environmental Health*. 110-136.

- Qu, F., Liang, H., Wang, Z., Wang, H., Yu, H., Li, G. (2012): Ultrafiltration membrane fouling by extracellular organic matters (EOM) of *Microcystis aeruginosa* in stationary phase: Influences of interfacial characteristics of foulants and fouling mechanisms. *Water Research* 46 (5), 1490-1500.
- Sellner, K. G., Doucette G. J a Kirkpatrick G. J. (2003): Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30 (7), 383-406.
- Sivonen, K., Jones, G. (1999): Cyanobacterial toxins. In: Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management (Chorus, I., Bartram, J., Eds.), *E & FN Spon Press*, London, 416 s.
- Schäfer, A. I., Fane, A. G., Waite, T. D. (1998): Chemical Addition prior to Membrane Processes for Natural Organic Matter (NOM) Removal, in: Chemical Water and Wastewater Treatment V. *Springer, 8th International Gothenburg Symposium*, Prague, 125-137.
- Shifrin, N. S., Chisholm, S. W. (1981): Phytoplankton lipids: Interspecific difference and effects of nitrate, silicite and light-dark. *Journal of Phycology* 17 (4), 374-384.
- Schmidt, W., Willmitzer, H., Bornmann, K., Pietsch, J. (2002): Production of drinking water from raw water containing cyanobacteria – Pilot plant studies for assessing the risk of microcystin breakthrough. *Environmental Toxicology* 17 (4), 375-385.
- Sukenik, A., Teltch, B., Wachs, A. W., Shelef, G., Nir, I., Levanon, D. (1987): Effect of oxidants on microalgal flocculation. *Water Research* 21 (5), 533-539.
- Šafaříková, J., Barešová, M., Pivokonský, M., Kopecká, I. (2013): Influence of peptides and proteins produced by cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the coagulation of turbid waters. *Separation and Purification Technology* 118, 49-57.
- Šejnohová L., Maršálek B., Drábková M. (2004): Autekologie rodu *Microcystis*-literární přehled. *Seminář „Cyanobakterie“*, Brno, 13-23.

- Takaara, T., Sano, D., Konno, H., Omura, T. (2007): Cellular proteins of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminum chloride. *Water Research* 41 (8), 1653-1658.
- Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, uveřejněno ve Sbírce zákonů č. 82/2004, 5402.
- Westrick, J. A., Szlag, D. C. Southwell, B. J., Sinclair, J. (2010): A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (5), 1705-1714.
- Xie, P., Ma, J., Fang, J., Guan, Y., Yue, S., Li, X., Chen, L. (2013): Comparison of Permanganate Preoxidation and Preozonation on Algae Containing Water: Cell Integrity, Characteristics, and Chlorinated Disinfection Byproduct Formation. *Environmental Science* 47 (24), 14051-14061.
- Yang, X., Guo, W., Shen, Q. (2011): Formation of disinfection byproducts from chlor(am)ination of algal organic matter. *Journal of Hazardous Materials* 197, 378-388.
- Zhang, X., Minear, R. A., Shen, Q. (2004): Removal of low-molecular weight DBPs and inorganic ions for characterization of high-molecular weight DBPs in drinking water. *Water Research* 40 (5), 1043-1051.
- Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld M., Puruhito E., Chen Y. (2010): Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. *Bioresource Technology* 101 (14), 5297-5304.
- Zhang, Y., Tian, J., Nan, J., Gao, S., Liang, H., Wang, M., Li, G. (2011): Effect of PAC addition on immersed ultrafiltration for the treatment of algal-rich water. *Journal of Hazardous Materials* 186 (2-3), 1415-1424.
- Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Deng, Y., Li, L., Deng, J., Tan, C. (2014): Characterization of algal organic matters of *Microcystis aeruginosa*: Biodegradability, DBP formation and membrane fouling potential. *Water Research* 52 (5), 199-207.

Znachor, P. (2005): Vodní květy řas a sinic. *Scientific American* 7, 42-51.

Znachor, P., Jurczak, T., Komárková, J., Jezberová, J., Mankiewicz, J., Kaštanovská, K., Zapomnělová, E. (2006): Summer changes in cyanobacterial bloom composition and microcystin concentration in eutrophic Czech reservoirs. *Environmental Toxicology* 21 (3), 236-243.

Znachor, P. (2008): Rozsivky – podivuhodné řasy v krabičce. *Živa* 1, 10-11.

Znachor, P., Šimek, K., Nedoma, J. (2012): Bacterial colonization of the freshwater planktonic diatom *Fragilaria crotonensis*: Biodegradability, DBP formation and membrane fouling potential. *Aquatic Microbial Ecology* 66 (1), 87-94.

Žárský, V., Kalina, T., Sulek, J. (1985): Notes on the sexual reproduction of *Chlamydomonas geitleri* Ettl. *Archiv für Protistenkunde* 130 (4), 343-353.